



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF CHEMISTRY OF FOOD AND BIOTECHNOLOGY

STUDIUM PRODUKCE LIPÁZ POMOCÍ VYBRANÝCH MIKROORGANISMŮ

STUDY OF LIPASE PRODUCTION USING SELECTED MICROORGANISMS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Bc. HANA ROŠKOVÁ

doc. Ing. JIŘINA OMELKOVÁ, CSc.

BRNO 2014



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce: **FCH-DIP0836/2013** Akademický rok: **2013/2014**
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Student(ka): **Bc. Hana Rošková**
Studijní program: Chemie a technologie potravin (N2901)
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)
Vedoucí práce: **doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.**
Konzultanti:

Název diplomové práce:

Studium produkce lipáz pomocí vybraných mikroorganismů

Zadání diplomové práce:

1. Vypracujte literární přehled k dané problematice
2. Popište použité metody hodnocení
3. Zpracujte naměřené výsledky z experimentů
4. Zhodnoťte získané výsledky formou diskuse

Termín odevzdání diplomové práce: 9.5.2014

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Hana Rošková
Student(ka)

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2014

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Diplomová práce byla zaměřena na studování lipolytické aktivity u sedmi mikroorganismů, u nichž byla produkce lipáz předpokládána či již potvrzena.

Teoretická část práce se zabývá obecnou charakteristikou lipolytických enzymů, specifiky mikrobiálních lipáz a průmyslovým využitím těchto enzymů. Experimentální část se pak zabývá studiem jednotlivých mikroorganismů a jejich lipolytickou aktivitou v přítomnosti sacharidového (glukóza) a lipidového zdroje uhlíku (řepkový olej) či jejich kombinace. Ze sedmi mikroorganismů, testovaných v přítomnosti jak lipidového, tak sacharidového zdroje uhlíku byly k dalším experimentům vybrány pouze *Rhodotorula minuta* a *Yarrowia lipolytica*, které byly následně testovány na lipolytickou aktivitu v přítomnosti různých druhů rostlinných olejů (olivový, slunečnicový, řepkový a řepkový přepálený olej). Dále byla ověřována reakce mikroorganismů na různé zdroje dusíku jak organického, tak anorganického původu (močovina, kvasničný extrakt, chlorid amonný, síran amonný) a přidavek detergentu, který je běžně používán v potravinářských či restauračních zařízeních.

ABSTRACT

Diploma thesis was aimed at studying of lipolytic activity of seven microorganisms, at which this activity was previously assumed or already confirmed.

Theoretical part deals with the general characteristics of lipolytic enzymes, specifics of microbial lipases and their industrial application, with an emphasis on food industry. Experimental part deals with the study of seven microorganisms and their lipolytic activity at the presence of a carbohydrate (glucose) or a lipid (canola oil) or both, as a source of carbon. For further testing were singled out *Rhodotorula minuta* and *Yarrowia lipolytica*. These yeasts were subsequently tested for lipolytic activity at the presence of different vegetable oils (olive, sunflower, canola oil and waste cooking oil), nitrogen sources of organic and inorganic origin (urea, yeast extract, ammonium chloride, ammonium sulfate) and also a addition of detergent, which is commonly used in food industry or other food facilities.

Klíčová slova: lipolytické enzymy, *Rhodotorula minuta*, *Yarrowia lipolytica*

Keywords: lipolytic enzymes, *Rhodotorula minuta*, *Yarrowia lipolytica*

ROŠKOVÁ, H. *Studium produkce lipáz pomocí vybraných mikroorganismů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014, 60 str. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.

Prohlášení:

Prohlašuji, že diplomovou práci jsem vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické Vysokého učení technického v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis

Poděkování:

Děkuji doc. Ing. Jiřině Omelkové, CSc. za cenné rady a pomoc při zpracování diplomové práce.

.....
podpis

OBSAH

Úvod.....	7
Teoretická část.....	8
1 Charakteristika lipáz	8
1.1 Struktura a mechanismus účinku.....	8
1.2 Specifita.....	11
1.2.1 Substrátová specifita.....	11
1.2.2 Regioselektivita.....	11
1.2.3 Stereospecifita	12
1.2.4 Nespecifické lipázy	12
1.3 Reakce katalyzované lipolytickými enzymy	12
1.4 Mikrobiální lipázy.....	14
1.4.1 Kvasinky.....	15
1.4.2 Bakterie	16
1.4.3 Vláknité houby.....	17
1.5 Rostlinné lipázy	17
1.6 Živočišné lipázy.....	17
2 Lipolytické mikroorganismy	18
2.1 Rod <i>Bacillus</i>	18
2.2 Rod <i>Geobacillus</i>	19
2.3 Rod <i>Rhodotorula</i>	19
2.4 Rod <i>Yarrowia</i>	20
2.5 Rod <i>Kluyveromyces</i>	22
3 Průmyslové využití lipolytických enzymů	23
3.1 Potravinářství	24
3.1.1 Mlékárenství	24
3.1.2 Zpracování tuků a olejů.....	25
3.1.3 Pekárenství	25
3.2 Průmysl detergentů	26
3.3 Výroba biopaliv.....	27
3.4 Medicínské aplikace	27
Cíle práce.....	29
Materiál a metody.....	30
1 Materiál	30
1.1 Seznam chemikálií	30
1.2 Roztoky a kultivační média.....	30

1.3	Přístroje a pracovní pomůcky	31
1.4	Mikroorganismy	31
2	Metody	32
2.1	Screening lipolytické aktivity	32
2.2	Stanovení lipolytické aktivity	32
2.2.1	Stanovení kalibrační křivky p-nitrofenolu	33
2.2.2	Stanovení v supernatantu	34
2.2.3	Stanovení v sedimentu	34
2.2.4	Stanovení růstové křivky	34
	Výsledky a diskuze	35
1	Screening vybraných mikroorganismů	35
2	Vliv přítomnosti lipidického zdroje uhlíku na růst a produkci lipáz	36
2.1	Médium s glukózou	36
2.2	Médium s glukózou a olejem	37
2.3	Médium s olejem	41
3	Vliv různých lipidových substrátů na růst mikroorganismů a produkci lipáz	43
4	Vliv přítomnosti detergentu na růst mikroorganismů a produkci lipáz	49
5	Vliv zdroje dusíku na růst mikroorganismů a produkci lipáz	55
	Závěr	58
	Seznam literatury	59

ÚVOD

Enzymy jako přírodní urychlovače chemických reakcí jsou v posledních letech stále více využívány v průmyslovém měřítku. Dosud bylo popsáno několik tisíc enzymů s odlišnou substrátovou specificitou, avšak jen zlomek byl plně charakterizován a izolován v čisté krystalické formě. Největší podíl na celosvětovém trhu s enzymy zaujímají proteázy, karbohydrázy a lipázy. Právě lipolytické enzymy přitahují díky svým unikátním vlastnostem stále více pozornosti. Pro svoji širokou substrátovou specificitu, vysokou selektivitu a vysoké výtěžky jsou lipázy perspektivními biokatalyzátory. Většina průmyslově používaných lipolytických enzymů je mikrobiálního původu. Do současnosti byla na lipolytickou aktivitu otestována asi 2 % všech mikroorganismů a plně charakterizováno a průmyslově využíváno je pouze 20 mikrobiálních lipáz.

Tato práce se zabývá produkcí lipolytických enzymů u vybraných druhů kvasinek a bakterií. Teoretická část tvoří úvod do problematiky lipáz – popisuje jejich strukturu a mechanismus účinku, zaměřuje se na vybrané mikrobiální producenty těchto enzymů a jejich specifika a popisuje možnosti průmyslových aplikací mikrobiálních lipolytických enzymů. V experimentální části je pak sledován vliv různých zdrojů uhlíku a dusíku a vliv přítomnosti detergentu na růst mikroorganismů a produkci lipáz.

TEORETICKÁ ČÁST

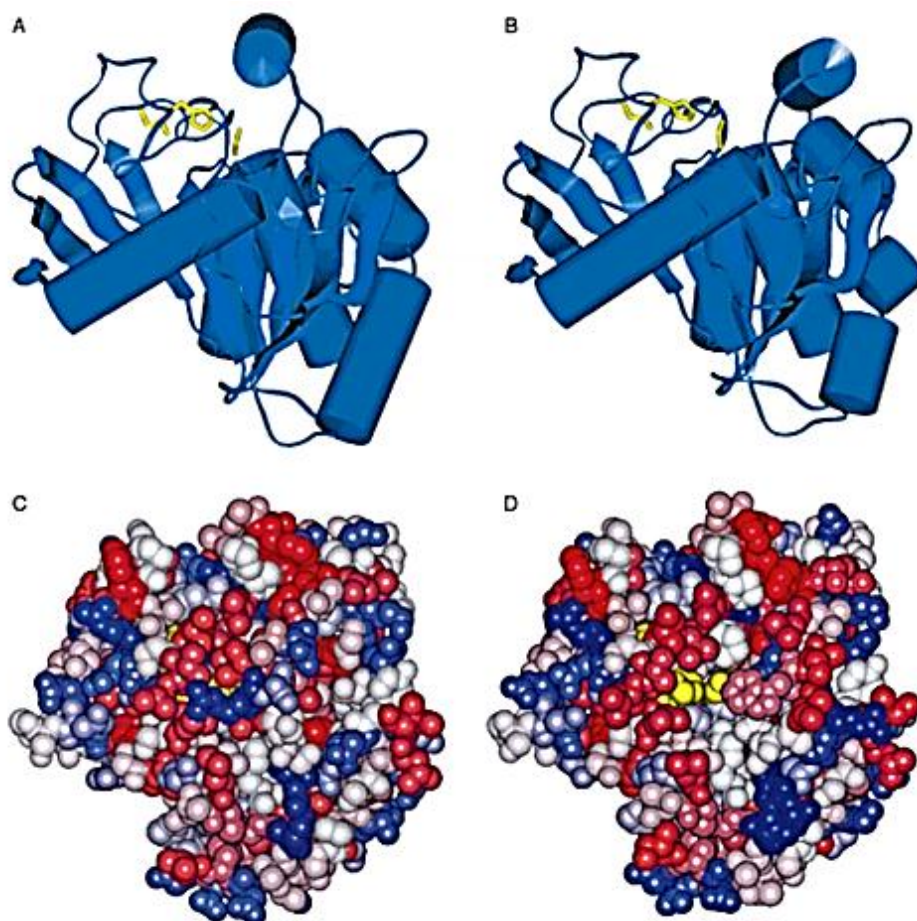
1 CHARAKTERISTIKA LIPÁZ

Lipázy (triacylglycerol acylhydrolázy, EC 3.1.1.3) jsou ubikvitní enzymy, které jsou produkovány napříč rostlinným, živočišným i mikrobiálním světem. Podstatou jejich fungování je katalytická přeměna triacylglycerolů s dlouhými řetězci mastných kyselin na volné mastné kyseliny, mono- a diacylglyceroly a glycerol. Tyto látky mají velice malou rozpustnost ve vodě, proto katalýza probíhá na rozhraní povrchů voda-tuk. Tato reakce je vratná – při velmi nízkých koncentracích vody v systému je možná syntéza esterů a transesterifikační reakce. Avšak právě schopnost reagovat v heterogenním systému, tedy na fázovém rozhraní voda-tuk, a vytvářet micely odlišuje „pravé“ lipázy od esteráz, jejichž preferovaným substrátem jsou ve vodě rozpustné estery. Lipázy hrají důležitou roli při transferu lipidů jak mezi organismy, tak v organismu samotném, například při trávení či naopak mobilizaci energetických zásob z tukových buněk. [1, 2]

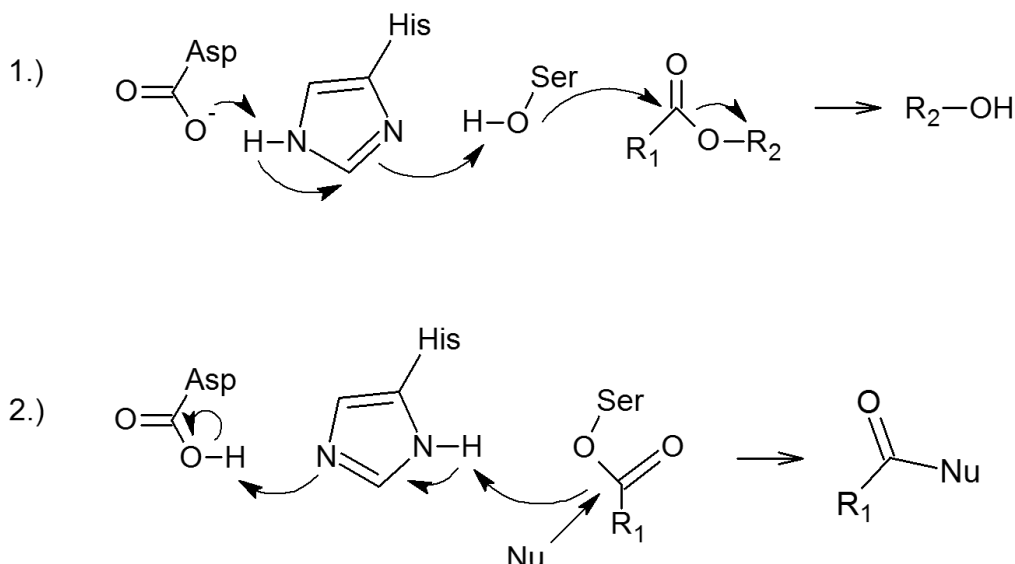
1.1 Struktura a mechanismus účinku

Všechny lipolytické enzymy vykazují určité podobnosti v primární a sekundární struktuře. Jejich sekundární struktura obsahuje α/β fold, v jehož centrální oblasti se nachází paralelní β -skládaný list, kde je lokalizována katalytická triáda His-Ser-Asp/Glu. Enzym je aktivován pohybem β -smyčky, která má efekt víka, a dochází tak k expozici hydrofobní kapsy s aktivním místem enzymu (**Obrázek 1**). Hydrofobní kapsy mohou mít v závislosti na druhu mikroorganismu různý tvar. Vazebná místa bakteriálních lipáz jsou umístěna na dně dlouhého hlubokého trychtýře, zatímco vazebná místa lipáz vláknitých hub jsou lokalizována ve štěrbině v blízkosti povrchu enzymu. Lipázy kvasinek pak váží mastné kyseliny v hydrofobní kapse a alkoholový zbytek je zpracováván v blízkosti povrchu enzymu. Tyto strukturní rozdíly vysvětlují rozdílné biochemické vlastnosti lipáz z různých mikrobiálních zdrojů. [3, 4]

Lipázy patří do skupiny serinových hydroláz, základním stavebním prvkem aktivních míst všech lipáz je tedy aminokyselina serin. Studie popisují prudký pokles aktivity enzymu, pokud byl Ser153 nahrazen jinou aminokyselinou (Ala, Cys, Phe, Val aj.). Společným znakem primární struktury lipolytických enzymů je opakující se sekvence aminokyselin Gly-X-Ser-X-Gly. Hydrofobicita aminokyselin obklopujících serin je důležitým faktorem lipolýzy na mezifázovém rozhraní. Reakční mechanismus serinových hydroláz je znázorněn na **Obrázek 2**. [3]



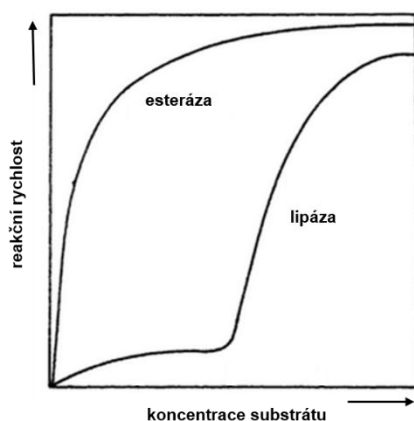
Obrázek 1 Struktura lipázy *Mucor miehei*. (A, C) uzavřená konformace, (B, D) otevřená konformace. Pohled z profilu (A, B): katalytická triáda (znázorněna žlutě) a α/β -fold jsou strukturní elementy společné všem lipázám. Pohled shora (C, D): prostorový model lipázy, polarita jednotlivých míst roste v pořadí tmavě modrá – světle modrá – bílá – světle červená – tmavě červená. Odklopením víka je zpřístupněna hydrofobní kapsa enzymu, region zprostředkující vazbu na fázové rozhraní se stává méně polárním. [5]



Obrázek 2 Reakční mechanismus katalytické triády v aktivním místě enzymu. 1.) Uspořádání aminokyselin v aktivním místě enzymu způsobuje pokles hodnoty pK_A serinové hydroxyskupiny, což umožňuje atak nukleofilu (Nu) na karbonylovou skupinu R_1COOR_2 , vazbu acylové skupiny substrátu na enzym a uvolnění alkoholu R_2OH . 2.) Nukleofil poté atakuje acyl-enzymový intermediát, dochází k regeneraci enzymu a uvolnění produktu. Nu = H_2O (hydrolýza), R_4-OH (alkoholýza), R_3-NH_2 (aminolýza), R_1COOR_4 (interesterifikace) aj. [2]

Právě schopnost katalytické hydrolýzy na fázovém rozhraní voda-tuk je mezi enzymy unikátní. Je prokázáno, že pankreatická lipáza vykazuje velice malou aktivitu v přítomnosti triacetinu (glyceroltriester kyseliny octové) v monomerní formě, ve vodě rozpustného triglyceridu s krátkými řetězci mastných kyselin. Jestliže však koncentrace stejného substrátu překročí limit rozpustnosti, tzv. kritickou micelární koncentraci, aktivita pankreatické lipázy se zvýší, neboť substrát vytváří emulzi či je agregován do koloidních micel. Oproti tomu esterázy reagují pouze s estery rozpustnými ve vodě a vykazují reakční kinetiku dle Michaelis-Mentenové (**Obrázek 3**). [6]

Reakce lipolytického štěpení na fázovém rozhraní voda-tuk prochází dvěma rovnovážnými stavy. Prvním je adsorpce lipázy na mezifázové rozhraní, kdy dochází ke konformačním změnám. Důsledkem je pak zvýšení aktivity enzymu $[E \leftrightarrow E^*]$. Druhým rovnovážným stavem je tvorba komplexu enzym substrát, kdy dochází k samotné lipolýze, tvorbě produktů a regeneraci enzymu. Zřejmě také dochází k desorpci enzymu z micelárního systému při každém uvolnění produktu a opětovné penetraci do mezifáze. Kinetika lipolytických reakcí byla studována na různých typech mezifázových prostředí, jako jsou emulze, monovrstvy, lipozomy či vezikuly. Různé typy rozhraní vykazují odlišnosti v kinetice hydrolytické reakce, jelikož distribuce enzymu v rovnovážných stavech se liší. [6]



Obrázek 3 Saturační křivka esterázy a pankreatické lipázy. [2]

1.2 Specifická

Mezi jednotlivými lipázami různého původu existují značné rozdíly ve specifitě vzhledem k poloze hydrolyzované esterové vazby, vázané mastné kyselině či v rychlosti štěpení. Dle specifity při katalýze hydrolytické reakce mohou být lipázy rozděleny do čtyř skupin, a to na substrátově specifické, regioselektivní, stereospecifické, a lipázy nespecifické.

1.2.1 Substrátová specifická

Substrátově specifické lipázy jsou takové enzymy, které preferují triglyceridy s obsahem určitých mastných kyselin, respektive typy mastných kyselin. Tyto enzymy odštěpují mastné kyseliny bez ohledu na jejich umístění v molekule triglyceridu. Příkladem může být lipáza plísňe *Geotrichum candidum*, která je díky přítomnosti kyseliny glutamové v katalytické triádě specifická vůči *cis*-9-nenasyceným mastným kyselinám. [4, 6]

Substrátová specifická určuje rychlost, kterou bude katalýza daného esteru probíhat. Preference enzymu vůči určitému substrátu jsou dány uspořádáním aminokyselin v aktivním místě enzymu, a tedy možností vázat jen molekuly určitého tvaru se schopností interakce s danou strukturou aktivního místa. Kvantitativně je substrátová specifická popisována jako poměr limitní rychlosti k Michaelisově konstantě (V_{lim}/K_m). Upřednostňovaným substrátem všech lipáz jsou triacylglyceroly. Existují však mikroorganismy, jejichž lipázy vykazují větší afinitu k mono- a diacylglycerolům či tyto parciální glyceridy neštěpí vůbec (*Penicillium sp.*). [3, 4]

1.2.2 Regioselektivita

Regioselektivita je definována jako schopnost enzymu rozpoznávat vnější a vnitřní pozice triglyceridové kostry. 1,3 - specifické lipázy upřednostňují *sn*-1 a *sn*-3 pozice před pozicí *sn*-2, avšak mezi polohami 1 a 3 nerozlišují. Příkladem producentů takovýchto lipáz jsou plísňe *Aspergillus niger* či *Rhizopus arrhizus*. *Sn*-2 selektivní lipázy jsou velice vzácné. Jediným dosud popsaným enzymem tohoto typu je lipáza kvasinky *Candida antarctica*. [7]

1.2.3 Stereospecifická

Tato vlastnost zobrazuje dvě důležité schopnosti lipolytických enzymů – schopnost rozpoznávat jeden z enantiomerů v racemické směsi a schopnost odlišovat molekulu chirální od molekuly achirální. Stereospecifická lipolytických enzymů závisí na interakcích substrátu v aktivním místě enzymu a do velké míry také na kultivačních podmínkách. Do kategorie stereospecifických lipáz spadá většina lipolytických enzymů rodu *Pseudomonas*, které jsou využívány při syntézách chirálních intermediátů při výrobě protirakovinné látky epotilonu či produkci (S)-indofanu, herbicidu používaného k likvidaci plevelu na rýžových polích. [8]

1.2.4 Nespecifické lipázy

Nespecifické lipázy nevykazují žádné poziční preference v molekule triacylglycerolu. Během katalytických reakcí tak vzniká náhodná směs produktů, podobně jako při katalýze chemické. Lipázy tohoto typu jsou produkovány například bakteriemi *Staphylococcus aureus*, *Candida cylindraceae* či *Corynebacterium acnes*. [9]

1.3 Reakce katalyzované lipolytickými enzymy

Kromě schopnosti hydrolyzovat triglyceridovou vazbu disponují lipázy další unikátní vlastností - jsou schopné katalyzovat také reakce syntetické. Do skupiny syntetických reakcí se řadí transesterifikace (interesterifikace, acidolýza, alkoholýza, aminolýza) a esterifikace. V přítomnosti organických rozpouštědel katalyzují také regioselektivní acylaci glykolů a mentholu. Schematický přehled reakcí je uveden v **Tabulka I**.

- **Interesterifikace**

Interesterifikační reakce je jeden z nejdůležitějších průmyslových procesů, díky kterému lze měnit fyzikálně-chemické vlastnosti olejů a tuků. Zahrnuje výměnu mastných kyselin, vázaných na glycerolu, proti původnímu tuku. Příkladem je přeměna levných olejů, například střední frakce palmového oleje, na dražší triglyceridy kakaového másla za použití lipáz *Rhizomucor miehei*. [10]

- **Acidolýza/alkoholýza**

Acidolýza je výměna mastné kyseliny triglyceridu za volnou mastnou kyselinu, acylovým donorem je tedy mastná kyselina. Alkoholýza je pak reakce triglyceridu s jednoduchým alkoholem či glycerolem za tvorby směsi mono- a diacylglycerolů. Akceptorem acylového zbytku je zde alkohol. [2]

Těchto typů reakcí je využíváno při zjemňování rybích olejů s vysokým obsahem polynenasycených mastných kyselin (PUFA), které při chemické syntéze snadno podléhají rozkladu za tvorby oxidačních produktů a polymerů. Reakce jsou katalyzovány lipázami *Pseudomonas sp.* [10]

- **Aminolýza**

Aminolýza je konverze aminů a alkoholů na amidy a estery nebo jakákoliv chemická reakce, kdy je molekula rozdělena na dvě části reakcí s aminem či amoniakem. Tuto reakci jsou schopny katalyzovat například lipázy *Candida antarctica* při produkci mastných alkoholamidů. [11]

- **Esterifikace**

Esterifikační reakce je reverzibilní proces hydrolýzy, kdy je reakční rovnováha posunuta směrem ke tvorbě esteru a je udržována nízkým obsahem vody v systému (literatura uvádí obsah vody mezi 0,75 a 4 % w/v, v závislosti na druhu syntézy). Lipázy jsou pak schopné tvořit esterové vazby mezi mastnými kyselinami a alkoholy. Takto katalyzované esterifikační reakce mohou být na rozdíl od chemických syntéz prováděny za pokojové teploty, při atmosférickém tlaku a při velmi mírném pH. Díky specifitě lipáz mají produkty také vyšší chemickou čistotu. [2, 10]

Tabulka I Přehled reakcí katalyzovaných lipázami.

HYDROLÝZA	$R_1-\overset{\text{O}}{\parallel}-O-R_2 + H_2O \longrightarrow R_1-\overset{\text{O}}{\parallel}-OH + R_2-OH$
ESTERIFIKACE	$R_1-\overset{\text{O}}{\parallel}-OH + R_2-OH \longrightarrow R_1-\overset{\text{O}}{\parallel}-O-R_2 + H_2O$
TRANSESTERIFIKACE Alkoholýza	$R_1-\overset{\text{O}}{\parallel}-O-R_2 + R_3-\underset{\text{OH}}{\text{CH}_2} \longrightarrow R_1-\overset{\text{O}}{\parallel}-O-R_3 + R_2-\underset{\text{OH}}{\text{CH}_2}$
Acidolýza	$R_1-\overset{\text{O}}{\parallel}-O-R_2 + R_3-\overset{\text{O}}{\parallel}-OH \longrightarrow R_3-\overset{\text{O}}{\parallel}-O-R_2 + R_1-\overset{\text{O}}{\parallel}-OH$
Aminolýza	$R_1-\overset{\text{O}}{\parallel}-O-R_2 + R_3-NH_2 \longrightarrow R_1-\overset{\text{O}}{\parallel}-NH-R_3 + R_2-OH$
Interesterifikace	$R_1-\overset{\text{O}}{\parallel}-O-R_2 + R_3-\overset{\text{O}}{\parallel}-O-R_4 \longrightarrow R_1-\overset{\text{O}}{\parallel}-O-R_4 + R_3-\overset{\text{O}}{\parallel}-O-R_2$

1.4 Mikrobiální lipázy

Lipázy mikrobiálního původu jsou skupinou enzymů s nejširším biotechnologickým využitím. Pozornost přitahují zejména díky všestrannosti použití, relativně snadné dostupnosti a nízkým nákladům na produkci ve srovnání s lipázami živočišného a rostlinného původu. Výhodou jsou také vysoké výtěžky enzymových reakcí a jednoduchost genetických modifikací mikroorganismů. [12]

Jejich produkce je silně ovlivněna výživovými a fyzikálně-chemickými faktory, jako jsou zdroje uhlíku a dusíku, přítomnost anorganických solí, teplota, pH či množství rozpuštěného kyslíku. Optimální produkční podmínky jsou součástí přísně střeženého know-how výrobních podniků.

Produkce mikrobiálních lipáz je ovlivněna následujícími faktory:

- **Zdroj uhlíku**

Zdroj uhlíku je hlavním faktorem ovlivňujícím produkci lipolytických enzymů. Lipázy jsou enzymy inducibilní, a jako takové jsou obvykle produkovány v přítomnosti lipidického substrátu, kterým mohou být triacylglyceroly, mastné kyseliny, hydrolyzovatelné estery či tweeny. Jejich tvorba je však výrazně ovlivněna také jinými uhlíkatými zdroji přítomnými v kultivačním médiu, například cukry, cukernými alkoholy či komplexními uhlíkatými substráty. Obecně platí, že produkce lipáz je stimulována vysokým podílem C18 mastných kyselin v lipidickém substrátu. Aktivita intracelulárních a extracelulárních lipolytických enzymů roste se stoupajícím množstvím lipidů v médiu, avšak nadměrné koncentrace mohou mít cytotoxické účinky. [10–12]

K objasnění indukčních účinků lipidických substrátů na produkci lipáz byly použity směsi uhlíkových zdrojů, skládající se z cukerné složky podporující růst a z lipidické složky jako induktoru. Přítomnost obou typů substrátů umožňovala sekvenční či simultánní využití substrátu v závislosti na typu metabolismu daného mikroorganismu. U kvasinky *Candida rugosa* byl pozorován zvýšený nárůst biomasy, avšak nebylo zaznamenáno žádné zvýšení lipolytické aktivity. Tyto výsledky naznačují možné konkurenční účinky cukerných a lipidických uhlíkových zdrojů a blízký vztah mezi produkcí extracelulárních lipáz a spotřebou mastných kyselin. Při studiu lipázové produkce *Yarrowia lipolytica* byl jako lipidický zdroj uhlíku použit odpadní kuchyňský olej, který v důsledku smažení prošel tepelným rozkladem a oxidačními a hydrolytickými reakcemi. Ve srovnání s olivovým olejem byl nárůst biomasy nižší asi o 30 %, což potvrzuje velký vliv chemického složení lipidů na produkci lipolytických enzymů. [13, 14]

- **Zdroj dusíku**

Mikroorganismy při produkci lipáz obecně upřednostňují dusík z organických zdrojů, jako je pepton či kvasničný extrakt (bakterie rodu *Bacillus*, *Pseudomonas*), nicméně některé bakteriální kmeny preferují dusík anorganického původu, jako jsou chlorid amonný či hydrogenfosforečnan amonný (plísně *Aspergillus niger*, *Acremonium strictum*). [15]

- **Kovové ionty**

Přítomnost kovových iontů coby kofaktorů lipolytických enzymů obvykle není nutná, nicméně je prokázáno, že dvojmocné kationty vápníku stimulují lipolytickou aktivitu některých mikroorganismů (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* apod.). Tato stimulace vápenatými ionty může mít několik vysvětlení: (1) mohou způsobovat přeměnu mastných kyselin, vzniklých při lipolýze, na nerozpustná vápenatá mýdla, což způsobuje změny na rozhraní substrát-voda, které vedou k vytvoření příznivých podmínek pro další působení enzymu, (2) mohou mít schopnost přímé aktivace enzymu na mezifázovém rozhraní či (3) mohou hrát roli ve stabilizaci enzymu. Obecně však platí, že lipázová aktivita je silně inhibována ionty těžkých kovů Co^{2+} , Ni^{2+} , Hg^{2+} a Sn^{2+} . Mírné inhibiční účinky pak mají ionty Zn^{2+} , Na^{2+} či Mg^{2+} . [10, 16]

- **pH a teplota**

Mikrobiální lipázy jsou stálé v širokém rozmezí hodnot pH a teplot, v závislosti na producentovi a prostředí, ve kterém se přirozeně vyskytuje. Bakteriální lipázy jsou stabilní při neutrálním či mírně alkalickém pH (6,0 – 7,5) s výjimkou lipáz *Pseudomonas fluorescens*, jejichž pH optimum je 4,8. Lipázy rodu *Bacillus* pak vykazují stabilitu v širokém rozmezí hodnot pH – hodnoty se pohybují od 4 do 11. Většina lipolytických enzymů produkovaných vláknitými houbami je naopak aktivní při pH kyselém (4,5 – 5,5), lipázy pocházející z kvasinek jsou aktivní při pH mírně kyselém. [17]

Mikrobní lipolytické enzymy jsou aktivní v širokém rozmezí teplot v závislosti na druhu mikroorganismu, ze kterého pocházejí. Byly izolovány jak termostabilní enzymy, aktivní při teplotách kolem 60 °C, tak psychrofilní lipázy, vykazující vysokou aktivitu v rozmezí od 0 °C do 5 °C. [10, 15]

- **Přítomnost inhibitorů**

Inhibitory lipáz mohou působit specificky či nespecificky. Do první skupiny patří deriváty kyseliny borité, které se reverzibilně vážejí k serinu v aktivním místě enzymu a triglycidridové substrátové analogy, například glyceroltriéter. Druhá skupina zahrnuje surfaktanty a žlučové soli, které však v některých případech mají účinek opačný - lipolytickou aktivitu stimulují. [8]

1.4.1 Kvasinky

Většina kvasničných lipáz jsou extracelulární monomerní glykoproteiny, jejichž molekulární hmotnost se pohybuje v rozmezí 33 až 55 kDa. Více jak 50 % dosud popsanych lipáz je produkováno ve formě různých izoenzymů. Teplotní optima se pohybují mezi 40 °C a 50 °C. Na rozdíl od lipáz bakteriálních, lipázy produkované kvasinkami nevykazují výraznou termotoleranci. Většina těchto enzymů denaturuje již při 60 °C. Oproti bakteriálním lipázám mají také poměrně úzký rozsah hodnot pH, při kterých jsou stabilní (6.0 – 8.0). [18]

1.4.2 Bakterie

Bakteriální lipázy jsou většinou zásaditého charakteru. Patří do skupiny glykoproteinů, některé však byly charakterizovány jako lipoproteiny. Jejich velikost se pohybuje od 20 do 60 kDa. Lipolytické enzymy jsou produkovány jak do extracelulárního prostředí, tak intracelulárně, některé kmeny produkují také lipázy vázané na buňku. V závislosti na produkčním kmeni jsou obvykle stabilní v rozmezí teplot od 27 °C do 80 °C, a v intervalu pH od 4,0 do 8,0. [11]

Transport lipolytických enzymů do vnějšího prostředí je zajišťován sekrečními systémy dvojího typu. Sekreční systém typu I (T1SS) je tvořen komplexem tří proteinových podjednotek, které jsou zodpovědné za aktivní přenos enzymů přes vnější i vnitřní membránu do prostředí. T1SS využívá například *Escherichia coli*. Sekreční systém typu II (T2SS) je systém dvoufázový. V první fázi je lipáza v nesbaleném stavu transportována do periplazmatického prostoru, kde dochází ke konformačním změnám, které jsou ve fázi druhé signálem k převedení enzymu na povrch bakterie bílkovinnými kanálky. T2SS je využíván k sekreci lipáz a fosfolipáz bakterie *Pseudomonas aeruginosa*. [19]

Na základě podobností strukturních motivů a biologických vlastností byly bakteriální lipolytické enzymy rozděleny do osmi tříd, které jsou detailněji popsány v **Tabulka II**.

Tabulka II Klasifikace bakteriálních lipolytických enzymů. [17]

třída	společný strukturní motiv	vlastnosti	zástupci
I.	Gly-X-Ser-X-Gly	"pravé" lipázy, fosfolipázy	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
II.	Gly-Asp-Ser-Leu	lipázy, esterázy	<i>Streptomyces scabies</i> , <i>Salmonella typhimurium</i>
III.	α/β -fold, Gly-X-Ser-X-Gly	extracelulární lipázy a esterázy	<i>Streptomyces albus</i> , <i>Moraxella sp.</i>
IV.	sekvenční podobnost s lidskou HSL	karboxylesterázy, extracelulární esterázy, lipázy	<i>Escherichia coli</i> , <i>Alcaligenes eutrophus</i> , <i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>
V.	α/β -fold, Gly-X-Ser-X-Gly	PHA-depolymerázy, lipázy, karboxylesterázy	<i>Pseudomonas oleovorans</i> , <i>Haemophilus influenzae</i>
VI.	katalytická triáda Ser-Asp- His, sekvenční podobnost s lysofosfolipázami	aktivní ve formě dimeru, katalýza malých molekul, neschopnost štěpit triglyceridy s dlouhými řetězci mastných kyselin	<i>Spirulina platensis</i>
VII.	sekvenční homology eukaryotních acetylcholinesteráz	esterázy	<i>Arthrobacter oxydans</i>
VIII.	sekvenční homology β -laktamáz, Ser-X-X-Leu v N-terminální oblasti	buněčně vázané a stereoselektivní esterázy	<i>Arthrobacter globiformis</i> , <i>Streptomyces chrysomallus</i>

1.4.3 Vláknnité houby

Lipázy pocházející z vláknitých hub jsou exocelulární enzymy, což je vlastnost usnadňující pozdější izolaci enzymu z kultivačního média. Molekulová hmotnost kolísá v intervalu od 27 do 120 kDa, aktivita v rozmezí pH od 4,0 do 11,0 a krajní body teplotního intervalu jsou 25 °C a 60 °C. *Geotrichum candidum* vykazuje unikátní specifitu vůči *cis*-9-nenasyceným mastným kyselinám. Lipázy *Rhizopus arrhizus* jsou glykoproteiny s obsahem cukrů třikrát vyšším než je živočišná pankreatická lipáza, avšak pro jejich enzymatickou aktivitu nejsou nezbytné. [20]

1.5 Rostlinné lipázy

Rostlinné lipázy zahrnují především fosfoproteiny, glykoproteiny a sulfoproteiny, jejichž molekulová hmotnost se pohybuje v intervalu od 40 do 143 kDa. Nacházejí se hlavně v olejnatých semenech a obilninách, kde slouží k mobilizaci energetických zásob při klíčení. Vykazují také značnou substrátovou selektivitu vůči triglyceridům s obsahem mastných kyselin s krátkým řetězcem, dominantním v dané rostlině (rychlost lipolýzy se snižuje ve směru od C4 k C18). Příkladem může být lipáza skočce obecného (zdroj ricinového oleje), specifická vůči triglyceridu kyseliny ricinolejové, či lipáza palmy olejné, specifická vůči trikaprinu a trilaurinu. Lipáza obsažená v semenech řepky olejné naopak neumí odštěpovat *cis*-4 či *cis*-6-nenasycené mastné kyseliny. Optimální hodnoty pH se obvykle nacházejí v rozmezí 6,0 – 8,0, existují však lipolytické enzymy s optimy v silně kyselé (lipázy skočce obecného, pH_{opt} 4,5) i silně alkalické oblasti (enzymy rýže seté, pH_{opt} 11,0). Optimální teploty se nejčastěji nachází v intervalu od 30 °C do 40 °C. [21]

1.6 Živočišné lipázy

Živočišné lipázy hrají důležitou roli při trávení lipidů přijatých v potravě. Aby mohly být tuky vstřebány, musí být transformovány do sloučenin rozpustných ve vodě. Mohou být jak extracelulární, tak intracelulární, vázané na buňku či endoplazmatické retikulum nebo se mohou vyskytovat volně v cytosolu. Vzhledem k odlišnostem v lokalizaci lipáz v buňkách, požadavkům na přítomnost kofaktorů a různorodým regulačním mechanismům jsou živočišné lipázy velice proměnlivé co do velikosti, substrátové a poziční specifity či rychlosti katalytické reakce. Většina živočišných lipolytických enzymů náleží do skupiny esteráz a thioesteráz. Molekulová hmotnost se pohybuje v rozmezí od 43 do 300 kDa, jsou tedy mnohem větší než lipázy bakteriální či rostlinné. Optimální hodnoty pH živočišných lipolytických enzymů se pohybují mezi 5,5 – 8,5, teplotní optima se pohybují v poměrně úzkém rozmezí, od 37 °C do 40 °C. [11]

2 LIPOLYTICKÉ MIKROORGANISMY

Rozklad tuků je schopna provádět celá řada mikroorganismů. Degradace probíhá při rozkladu organické hmoty a je závislá na jejím složení a na faktorech okolního prostředí. Odbourání lipidů probíhá převážně za aerobních podmínek, avšak anaerobní odbourání tuků nelze zcela vyloučit. Lipolytické pochody nejsou z energetického hlediska pro mikroorganismy výhodné, přesto je celá řada mikrobů vybavena enzymy, jejichž produkce je aktivována zvýšeným množstvím lipidů v prostředí. Mezi rody s prokázanou lipolytickou aktivitou patří mimo jiné také *Bacillus subtilis*, *Geobacillus stearothermophilus*, některé kvasinky rodu *Rhodotorula*, *Yarrowia lipolytica* a *Kluyveromyces marxianus*.

2.1 Rod *Bacillus*

Bakterie rodu *Bacillus* se dle Bergeyho manuálu systematické bakteriologie zařazují do 13. sekce – mezi sporulující grampozitivní tyčinky a koky. Tvoří bělavé až nahnědlé nepravidelné kolonie buněk. Jejich spory jsou oválné, buňku nezduřující a jsou termorezistentní, odolávají teplotě 120 °C po dobu 30 minut. Optimální hodnoty pH se pohybují v rozmezí 5,5 – 8,5. Jejich metabolismus je aerobní a vyskytují se v půdě, vodě či jsou asociovány s rostlinami. [22, 23]

Bacillus subtilis patří spolu s *Escherichia coli* k nejlépe prozkoumaným prokaryotním organismům a je obecně považován za bezpečný (**G**enerally **R**ecognized **A**s **S**afe, GRAS). K nejlépe prostudovaným lipázám této bakterie patří lipázy A (*lipA*) a B (*lipB*). Jsou to typické mezofilními enzymy s teplotním optimem při 37 °C, avšak ve srovnání s lipázami jiných mikroorganismů jsou v mnoha ohledech výjimečné. S jejich velikostí 19 kDa se pohybují na spodní hranici velikostního rozmezí bakteriálních lipáz a jejich pH optimum je pohybuje kolem hodnoty 10,0 – jsou tedy alkalofilní. Jsou to jedny z mála lipolytických enzymů, které nevykazují aktivaci na fázovém rozhraní voda-tuk. To je způsobeno absencí víka ve struktuře enzymu, hydrofobní kapsa s aktivním místem je tedy stále přístupná. Důsledkem této strukturní anomálie je katalytická aktivita vykazující kinetiku dle Michaelis-Mentenové, která není pro lipolytické enzymy typická. Každá z lipáz produkovaných *B. subtilis* má odlišné vlastnosti a je produkována v odlišném prostředí. Zatímco *lipA* hydrolyzuje triglyceridy s dlouhými řetězci mastných kyselin a je produkována jak v bohatých, tak v minimálních médiích, *lipB* štěpí estery triacylglycerolu a estery *p*-nitrofenolu s řetězci mastných kyselin kratšími jak 10 uhlíků a je produkována pouze v bohatých médiích. [24]

Ke zjištění optimálního složení kultivačního média pro druhy rodu *Bacillus* byly studovány různé zdroje uhlíku sacharidického (mannitol, maltóza, dextróza, sacharóza, salicin, fruktóza, glukóza a glycerol) i lipidického charakteru (Tween 20, Tween 80 a olivový olej) a dusíku. Největší aktivita byla detekována v přítomnosti sacharidů salicinu a fruktózy, naopak glukóza měla na produkci lipáz represivní účinky. Nejvhodnějším induktorem z řad lipidů pak byl Tween 80, poté olivový olej a nakonec Tween 20. Optimálním zdrojem dusíku se pak ukázal být kvasničný extrakt. [25]

Průmyslovou produkci lipáz *B. subtilis* znesnadňuje fakt, že tyto enzymy jsou produkovány s velmi nízkými výtěžky. Ke zvýšení jejich produkce jsou intenzivně studovány možnosti rekombinantní DNA technologie. Studie prokázaly, že lipázy *B. subtilis* jsou účinněji produkovány v hostitelských systémech, např. v *Escherichia coli*. [26]

2.2 Rod *Geobacillus*

Druhy rodu *Geobacillus* jsou systematicky řazeny do stejné sekce jako druhy rodu *Bacillus*. Fylogeneticky odlišné, avšak fyziologicky a morfologicky konzistentní taxon termofilních bacilů byl teprve nedávno oddělen od rodu *Bacillus*. Tyto v přírodě hojně zastoupené aerobní nebo fakultativně anaerobní bakterie tyčinkovitého tvaru tvoří v buňce jednu endosporu. Její umístění je terminální nebo subterminální. Vyskytují se jednotlivě nebo v krátkých řetězcích. Teplotní optimum těchto bakterií se pohybuje v rozmezí od 55 °C do 65 °C. [27, 28] Z biotechnologického hlediska jsou druhy rodu *Geobacillus* zajímavé právě svou termofilitou. Důsledkem je produkce termostabilních enzymů, odolných také vůči chemické denaturaci organickými rozpouštědly, detergenty či chaotropními činidly. Této vlastnosti je využíváno při enzymatickém odbourávání lipidů či při zpracování odpadních vod z ropného průmyslu, které probíhají za vysokých teplot. Teploty tání některých lipidů, zejména pak nasycených, se totiž pohybují vysoko nad pokojovou teplotou, a dochází tak k inhibici enzymů pocházejících z mezofilních zdrojů. Termofilní kmeny lze také použít k nastartování procesu hydrolýzy lipidů, avšak tato možnost je nevýhodná z důvodu nízkých výtěžků. Dobrou alternativou průmyslové výroby lipolytických enzymů je pak produkce rekombinantních enzymů, tedy exprese cizího proteinu v prokaryotických systémech. Studie popisují lipázy, izolované z kmenů pocházejících z geotermálních pramenů, které vykazují velmi dobrý růst na širokém spektru lipidických substrátů. Tyto lipázy jsou aktivní v širokém rozmezí teplot (10°C až 90°C) i pH (5,0 až 11,0) a svoji tepelnou stabilitu neztrácejí ani po vnesení genu do mezofilního hostitele. Dále byla identifikována termostabilní lipáza bakterie *Geobacillus thermodenitrificans*, kterou lze produkovat i na úrovni bioreaktoru s velmi vysokými výtěžky. [27–29]

2.3 Rod *Rhodotorula*

Kvasinky rodu *Rhodotorula* jsou jednobuněčné houbové mikroorganismy patřící do skupiny *Fungi imperfecti* – jsou imperfektní formou rodu *Rhodospiridium*. Buňky jsou kulovitého, oválného až tyčinkovitého tvaru, množící se pučením a jejich kolonie jsou zpravidla narůžovělého až červeného zbarvení. V přírodě jsou běžně rozšířeny saprofytickými kvasinkami. Byly však izolovány také z mlékárenských výrobků, z moče, stolice či sputa. [30] Kvasinky *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula minuta* a *Rhodotorula graminis* jsou lipofilní mikroorganismy, schopné produkovat a hromadit lipidy ve velmi vysokých množstvích (až 70 % w/w biomasy), avšak informace o lipázách a o faktorech ovlivňujících jejich produkci jsou velmi omezené. [31]

R. glutinis produkuje jak lipázy extracelulární, tak enzymy vázané na buňky. Při zkoumání jejich termostability bylo zjištěno, že extracelulární lipáza podléhá inaktivaci teplotách nad 40 °C, kdy ztrácí až 85 % aktivity, na rozdíl od intaktních buněk, které si zachovávají vysokou míru lipolytické aktivity i při teplotách kolem 60 °C, kdy dochází ke ztrátám kolem 45 %. Tyto výsledky naznačují, že vazba lipolytických enzymů na buněčnou stěnu plní zároveň ochrannou funkci při zvýšených teplotách. Zároveň tyto lipázy vykazují jistou specifitu vůči mastným kyselinám s krátkým (C6) a dlouhým (C12) uhlíkovým řetězcem. [32–34]

Studován byl také vliv zdroje uhlíku na produkci lipáz *Rhodotorula glutinis*. Největší aktivita byla pozorována v médiu s olivovým olejem jako jediným zdrojem uhlíku. V přítomnosti jiných substrátů (palmový olej, slunečnicový olej a Tween 80) lipolytická aktivita výrazně klesla, a to až desetkrát. [34]

Lipolytická aktivita buněk *Rhodotorula minuta* byla testována v makroemulzním prostředí lecitin-voda-izooktan (emulze typu voda v oleji). Jako substrát byl použit *p*-nitrobutyrát a k ověření stereospecifity lipáz byl pak použit (*RS*)-mentylsukcinát. Byla potvrzena jak lipolytická aktivita, tak vysoká míra stereospecifity enzymů *Rhodotorula minuta*. [35]

Rhodotorula graminis byla částečně charakterizována pouze z hlediska produkce lipidů. Schopnost tvorby tukových látek a jejich složení bylo zkoumáno v přítomnosti hexóz, pentóz či glycerolu coby jediných zdrojů uhlíku. Nejvyšší koncentrace biomasy bylo dosaženo v přítomnosti glukózy, nižších hodnot bylo dosaženo v přítomnosti pentóz a glycerolu. Analýza složení lipidů obsažených v buňkách kultivovaných na glukóze pak ukázala vysoký podíl kyseliny olejové (53 % w/w) a kyseliny palmitové (23 % w/w). [36]

2.4 Rod *Yarrowia*

Rod *Yarrowia* patří v říši hub do rodiny *Dipodascaceae*. Tento rod je monotypický – obsahuje jediného zástupce - *Yarrowia lipolytica* (dříve známá jako *Candida lipolytica*). *Y. lipolytica* je dimorfní houba – v závislosti na růstových podmínkách a kmeni se vyskytuje ve formě kvasinkových buněk či tvoří pseudohyfy nebo hyfy septované. Tvary kolonií jsou různorodé, od hladkých a lesklých po matné a strukturované. Většina kmenů je striktně aerobních a není schopná růst při teplotách vyšších jak 32 °C. *Y. lipolytica* je považována za nepatogenní mikroorganismus (GRAS). Byla izolována z potravin, zejména mléčných produktů, a odpadních vod. [18]

Lipázy *Y. lipolytica* jsou extracelulární, intracelulární i vázané na buňku. Genetická informace tohoto mikroorganismu obsahuje 16 paralogních genů kódujících lipázy, z nichž byly dosud popsány pouze tři extracelulární izoenzymy – *lip2p*, *lip7p*, *lip8p*. Neprostudovanější je pak *lip2p*. Substrátová specifita těchto enzymových paralogů je vzájemně komplementární. Zatímco *lip2p* vykazuje aktivitu vůči mononenasyceným (C18:1)-mastným kyselinám a esterům mastných kyselin s dlouhým řetězcem (C12, C14 a C16), *lip7p* hydrolyzuje estery s krátkými řetězci mastných kyselin (C6) a *lip8p* preferuje štěpení mastných kyselin se střední délkou řetězce (C8-C10). *Lip2p* a *lip8p* mohou být tedy považovány za „pravé“ lipázy, zatímco *lip7p* se řadí spíše k esterázám. Optimální pH *lip2p* se nachází v mírně kyselé oblasti (6,0 – 7,5), avšak závisí na délce řetězce substrátu a kultivačních podmínkách. *Lip2p* je stabilní v rozmezí pH 3,5 až 9,0, ale inaktivace, k níž dochází v silně alkalickém prostředí, je ireverzibilní. Teplotní optimum je mezi 37 °C a 40 °C. Vykazuje také poměrně velkou stabilitu vůči organickým rozpouštědlům, s výjimkou acetonitrilu, vůči kterému je citlivá. Po vystavení 10% acetonu, metanolu, etanolu, izopropanolu a dimetylsulfoxidu si zachovává 90 % své původní aktivity. [37]

Zdroj uhlíku a dusíku produkci lipáz silně ovlivňuje. Kultivační média obsahující glukózu, glycerol nebo anorganický zdroj dusíku typu NH_4Cl či $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ syntézu lipáz nestimulují, ačkoliv samotný růst buněk podporují. Přítomnost komplexních dusíkatých sloučenin a mastných kyselin, jako jsou kyselina olejová, kyselina linoleová či komplexních lipidických substrátů jako je olivový olej naopak vede k významnému zvýšení tvorby lipolytických enzymů. Byl studován také vliv kombinovaného zdroje uhlíku, kdy byla v médiu přítomna jak glukóza, tak olivový olej. Bylo zjištěno, že glukóza má na produkci lipáz inhibiční účinky – tvorba lipolytických enzymů je utlumena až do chvíle, kdy je glukóza z média spotřebována, teprve poté dochází ke zvýšení produkce lipáz a využití lipidického substrátu. Studie popisují také použití odpadního fritovacího coby zdroje uhlíku. [37–39]

Y. lipolytica produkuje kromě lipáz také proteázy, zejména pak alkalickou extracelulární proteázu (**Alkaline Extracellular Protease**, AEP), která je sekretována paralelně s lipázami. V důsledku produkce AEP dochází ke snížení lipolytické aktivity a pH kultivačního média dosahuje alkalických hodnot. To naznačuje proteolytické působení AEP na lipolytické enzymy. [39]

Pro pozdější technologické aplikace je důležitá úchova izolovaného enzymu. Nejvhodnější formou při dlouhodobém skladování lipolytických enzymů je forma lyofilizátu. Pro větší stabilitu a odolnost enzymu vůči vnějším faktorům (pH, teplota, oxidační vlivy) jsou lipolytické enzymy dodávány ve směsi s 12% sušeným mlékem a 3% arabskou gumou (w/v). Vápenaté ionty obsažené v sušeném mléce zvyšují aktivitu izolovaného enzymu, zatímco kasein enzym stabilizuje a usnadňuje interakci s hydrofobním substrátem na fázovém rozhraní. Kromě sušeného mléka lze použít také směs 12% maltodextrinu, 6% arabské gumy a 3% CaCl_2 (w/v). [37]

2.5 Rod *Kluyveromyces*

Rod *Kluyveromyces* patří do rodiny *Saccharomycetaceae* a původně byl v rámci této rodiny zařazován do rodu *Saccharomyces*. Podrobnější zkoumání však odhalilo fyziologické a morfologické odlišnosti, proto byl od rodu *Saccharomyces* oddělen. Buňky tohoto rodu jsou elipsoidní až cylindrické a vyskytují se samotné, v párech nebo v řetězcích. Tvoří spory rozličných tvarů, od kulovitých až po obloučkovité. Druhy rodu *Kluyveromyces* vytváří pseudomycelium, pravé mycelium však netvoří. Na kapalných půdách vzniká mázdra nebo kožka. Biomasa často obsahuje heminové červenohnědé barvivo. Patří mezi teplomilné kvasinky – snášejí teplotu až 47 °C. [22]

Kluyveromyces marxianus je považován za obecně bezpečný mikroorganismus (GRAS). Byl izolován z potravin, zejména pak z mléčných produktů. Je využíván zejména k produkci β -galaktosidázy, inulinázy a pektinázy a dále k redukci laktózy v potravinářských produktech. O produkci lipolytických enzymů však je k dispozici velmi málo informací. [40]

Lipolytická aktivita *Kluyveromyces marxianus* byla studována v médiích s tributyrinem, olivovým či slunečnicovým olejem a kyselinou olejovou nebo palmitovou. Zvýšená produkce lipolytických enzymů byla detekována pouze v případě tributyrinu, což naznačuje preference lipáz vůči triacylglycerolům s krátkými řetězci mastných kyselin. Ve srovnání s ostatními substráty byl však zaznamenán menší nárůst biomasy. Zvýšený růst buněk byl detekován pouze při použití kyseliny olejové. Dále byl studován vliv surfaktantů na produkci lipáz. Byly použity tyto povrchově aktivní látky: Tween 80, Triton X-100, arabská guma a PEG-200. Tyto látky jsou často používány jako permeabilizační činidla, nicméně jejich účinek je silně závislý na studovaném mikrobiálním kmeni. Účinky mohou být jak stimulační, tak inhibiční. V případě *Kluyveromyces marxianus* nebyly zaznamenány žádné výrazné účinky na produkci lipáz. Při studiu vlastností samotných lipáz bylo zjištěno pH optimum 4,0 a značná citlivost vůči alkalickým hodnotám – 24 h inkubace při pH 8 lipolytické enzymy zcela deaktivovala. Tepelná stabilita těchto enzymů je srovnatelná se stabilitou lipáz termofilních mikroorganismů. Při inkubaci při 100 °C byl enzym aktivní po dobu 16 minut a při inkubaci při 50 °C po dobu 9 dní si enzym zachoval 73 % původní aktivity. [41]

3 PRŮMYSLOVÉ VYUŽITÍ LIPOLYTICKÝCH ENZYMŮ

Lipolytické enzymy díky svým unikátním vlastnostem přitahují stále více pozornosti. Tvoří skupinu biotechnologicky perspektivních biokatalyzátorů, jejichž potenciál stále nebyl plně využit. Se stoupajícími nároky na minimalizaci nákladů a ekologičnost technologických výrob stoupá také potřeba vyvíjet nové, efektivnější technologické postupy. Většina lipolytických enzymů, které jsou v současnosti průmyslově využívány, jsou mikrobiálního původu a jsou produkovány submerzními fermentacemi, což umožňuje větší kontrolu kultivačních podmínek ve srovnání s fermentacemi typu solid-state. [42]

Enzymová katalýza má oproti chemicky řízeným reakcím několik výhod: (1) reakce jsou specifické, nehrozí tudíž vznik vedlejších produktů, (2) umožňují katalýzu za mírnějších podmínek, (3) enzymy je možné imobilizovat, což umožňuje jejich opětovné použití a je tak zvýšena ekonomika celé reakce, (4) poskytují vyšší výtěžky reakcí. [43]

Výčet aplikací lipolytických enzymů v průmyslu je uveden v **Tabulka III**.

Tabulka III Využití lipáz v průmyslu. [44]

Odvětví	Použití	Reakce	Produkt
pekárenství	prodloužení trvanlivosti, zlepšení chuti výrobku	hydrolýza	pekařské výrobky
průmysl nápojů	aromatizace, urychlení fermentace	hydrolýza	alkoholické nápoje
mlékárenství	zrání sýra, hydrolýza mléčného tuku, modifikace máselného tuku,	hydrolýza	sýr, mléčné produkty
masný průmysl, zpracování ryb	Vývoj chuti, odstranění nadbytečného tuku	hydrolýza	výrobky z masa a ryb
kosmetický průmysl	odstraňování tuku, tvorba emulzí, aromatizace	syntéza, transesterifikace	zeštíhlující kosmetika, hydratační krémy
zpracování tuků a olejů	modifikace poměru polynenasycených mastných kyselin, výroba strukturovaných tuků	transesterifikace, reesterifikace	rostlinné oleje, margaríny, kakaové máslo
paliva	konverze rostlinných olejů na estery	transesterifikace	bionafta
čisté chemikálie	syntéza esterů, enatiomerů, výroba chemikálií vysoké čistoty	syntéza	chirální intermediáty, estery
kožařství	odstranění zbytkového tuku z kůží	hydrolýza	kožené výrobky
medicínské aplikace	substituční terapie, kvantifikace triglyceridů, biosenzory	hydrolýza, transesterifikace	přípravky na podporu trávení, analytické soupravy k vyšetření krve

3.1 Potravinářství

Většina průmyslově používaných enzymů je určena pro zpracování potravin, zejména pak pro vývoj chuti v mléčných výrobcích a zpracování dalších potravin jako jsou maso, zelenina, ovoce, pekárenské produkty či pivo. Potravinářské enzymy působí jako biokatalyzátory biochemických reakcí. Do potravin jsou přidávány zejména z technologických důvodů. V současné době se používání a označování potravinářských enzymů řídí Nařízením Evropského parlamentu a Rady 1332/2008. Zákon rozlišuje potravinářské enzymy a potravinářský enzymatický přípravek. Potravinářským enzymem se rozumí produkt získaný z rostlin, zvířat či mikroorganismů nebo z jejich produktů, a to i produkt získaný kvasným procesem za použití mikroorganismů. Potravinářským enzymatickým přípravkem je pak směs skládající se z jednoho či více potravinářských enzymů, v níž jsou obsaženy látky jako přídatné látky či jiné potravinové složky s cílem usnadnit skladování, prodej, standardizaci, ředění nebo rozpouštění. [45]

Ve vývoji a využívání enzymů v potravinářství nastal v posledních letech enormní růst. Důvodem je široká škála účelů, k nimž lze enzymy používat, a také příznivá cena enzymových preparátů. Velký důraz je kladen na bezpečnostní hodnocení lipolytických enzymů používaných v potravinářství. Je důležité, aby lipázy pocházející z mikrobiálních zdrojů nevykazovaly žádnou toxicitu při použití v potravinářských produktech. Hodnocení bezpečnosti zahrnuje testování akutní, subakutní a subchronické orální toxicity a mutagenního potenciálu. Jako bezpečné byly označeny například lipázy rodů *Penicillium camemberti* a *Rhizopus oryzae*. Také enzymy *Aspergillus niger* jsou obecně považovány za bezpečné (GRAS), ačkoliv nové a neznámé izoláty musí být testovány na produkci ochratoxinu A. [46, 47]

Lipázami produkované estery hrají důležitou roli v potravinářském průmyslu jako chuťové a aromatické složky. Získávání aromatických sloučenin z rostlin je ekonomicky nevýhodné, a proto jsou rostlinná aromata nahrazována syntetickými aromatickými estery. Ty zahrnují celou řadu různých alifatických a aromatických sloučenin, které jsou zařazovány mezi potravinářská aditiva. Chuťové estery jsou nízkomolekulární sloučeniny syntetizované esterifikací mastných kyselin pomocí mikrobiálních lipáz. Přestože byly vyrobeny uměle, nesou tyto sloučeniny označení přírodní. Ze syntetických esterů lze uvést etylacetát, etylbutyrát, etylmethylbutyrát, etylvalerát a etylkaprylát. [2, 19]

3.1.1 Mlékárenství

Při výrobě mléčných produktů jsou lipázy využívány k hydrolýze mléčného tuku, a to zejména u sýrů vyžadujících specifické aroma, které vzniká v důsledku různé délky uhlíkového řetězce mastných kyselin. Samostatně je hydrolyzovaný mléčný tuk připravován z kondenzovaného mléka nebo máslového oleje pomocí lipáz, které uvolňují volné mastné kyseliny. Hydrolyzovaný mléčný tuk našel uplatnění také mimo mlékárenský průmysl - v čokoládových polevách či v umělých chuťových přísadách. Z bakteriálních kmenů jsou k produkci lipáz využívány *Achromobacter sp.* a *Pseudomonas sp.*, k výrobě dlouhozrajících sýrů typu parmezán jsou pak používány lipázy rodu *Lactobacillus*. [2, 19]

Součástí některých potravin je také enzymaticky modifikovaný sýr (**Enzyme Modified Cheese, EMC**). EMC je koncentrované ochucovadlo, vyráběné inkubací sýřeniny s lipolytickými enzymy za zvýšené teploty. Díky obsahu mastných kyselin s krátkým řetězcem (C2-C6) má EMC intenzivnější chuť než přirozeně zrající sýr. EMC je součástí potravin s příchutí sýra, jako jsou polévky, omáčky či smažené bramborové lupínky. [19]

3.1.2 Zpracování tuků a olejů

Umístění mastných kyselin na glycerolovém skeletu, délka řetězce mastné kyseliny a stupeň nenasycenosti jsou důležité pro určení fyzikálních vlastností olejů a tuků, na kterých závisí jejich výživové a sensorické vlastnosti. Některé tuky jsou proto hodnotnější než jiné. Rostlinné tuky s obsahem strukturovaných triacylglycerolů a změněnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi mají velký potenciál. Levné oleje mohou být modifikovány na nutričně hodnotné tuky, jako jsou náhražky kakaového másla, nízkokalorické triglyceridy a oleje obohacené o polynenasycené mastné kyseliny či kyselinu olejovou. Méně kvalitní tuky bývají převáděny na kvalitnější různými chemickými metodami, které jsou však energeticky náročné a mohou poskytovat zcela náhodné produkty. Enzymová transesterifikace levnějších olejů s využitím mikrobiálních lipáz tyto problémy zcela eliminuje. Lze tak vyrábět náhražky kakaového másla ze střední frakce palmového oleje, kdy je kyselina palmitová nahrazena kyselinou stearovou, či zlepšit poměr omega-6/omega-3 mastných kyselin v rostlinných olejích. K tomuto účelu jsou využívány zejména lipázy *Mucor miehei*, *Aspergillus niger* a *Aspergillus oryzae*. [19, 46]

Fosfolipázy *Aspergillus niger* jsou využívány také jako „zelená“ alternativa klasických technik při procesu odsuzování rostlinných olejů, jehož cílem je odstranění všech rozsuspendovaných látek, zejména fosfolipidů. [46]

3.1.3 Pekárenství

Emulgátory jsou látky přidávané do pečiva kvůli zvětšení objemu, zlepšení textury a prodloužení trvanlivosti. Jsou snadno detekovatelné a jejich obsah musí být uváděn na obale výrobku. Enzymy přidávané do těsta plní stejnou funkci, jsou však během pečení denaturovány. Použití směsi enzymů je východiskem při snižování počtu těžko nahraditelných aditiv, jako jsou DATEM (diglyceridy diacetyl-esterů kyseliny vinné), SSL (stearoyl-laktylát sodný) nebo ADA (azodikarbonamid). Lipázy se používají pro zvýšení emulgate bílkovin a škrobů, xylanázy změkčují těsto a zvyšují objem pekařských výrobků, proteázy snižují dobu zpracování těsta, amylázy prodlužují čerstvost pečiva. K pekárenským účelům jsou používány lipázy *Bacillus subtilis*. [19, 47]

3.2 Průmysl detergentů

Lipázy jsou v současné době součástí více jak poloviny pracích a čisticích prostředků běžně používaných v domácnostech a profesionálních provozech. Lipázy používané v průmyslu detergentů tvoří až 32 % celkového trhu s lipolytickými enzymy, ročně je produkováno 13 bilionů tun detergentů, v nichž je obsaženo asi 1000 tun lipolytických enzymů. Tyto přípravky zlepšují některé vlastnosti textilií, jako jsou pružnost či antistatika. Termostabilita a vysoká aktivita v alkalickém prostředí jsou vlastnosti nezbytné pro použití lipáz v detergitech. Dalšími požadavky jsou (1) nízká substrátová specifita, tzn. schopnost hydrolyzovat široké spektrum lipidů, (2) odolnost vůči podmínkám během pracích a mycích cyklů (pH 10,0 – 11,0, teploty kolem 60 °C), a (3) odolnost vůči povrchově aktivním látkám a dalším složkám detergentů. Moderní práškové detergenty obsahují i více typů enzymů – kromě lipáz jsou to amylázy, proteázy či celulázy. Současným trendem v oboru čisticích prostředků jsou přípravky používané při nízkých teplotách praní. Pomáhají tak prodloužit životnost textilií – zachovávají strukturu a kvalitu tkaniny. [2, 48]

Použití enzymů místo chemických detergentů je šetrné k životnímu prostředí, jelikož snižuje teplotu čisticích cyklů, enzymy jsou biologicky odbouratelné, nemají negativní dopad na procesy v čističkách odpadních vod a nepředstavují riziko pro vodní organismy. [2]

První komerční rekombinantní lipáza „Lipolase“ určená k použití v detergitech byla na trh uvedena v polovině 90. let minulého století firmou Novo Nordisk. Pocházela z plísně *Thermomyces lanuginosus* a produkčním mikroorganismem byl *Aspergillus niger*. Ačkoliv první přípravek obsahoval lipázu pocházející z plísně, v dalších letech byly upřednostněny lipázy bakteriální. Kyselé pH optimum enzymů plísní nebylo totiž kompatibilní s alkalickými podmínkami v čisticích zařízeních. [19]

Lipáza stabilní v přítomnosti ostatních složek detergentu byla dále izolována z bakterie *Burkholderia cepacia*, alkalické lipázy rodu *Pseudomonas* pak vykazovaly vysokou stabilitu při nízkých teplotách a zlepšovaly výsledek praní. [15, 19]

3.3 Výroba biopaliv

Biodiesel či bionafta je alternativa fosilního ropného paliva pro vznětové motory. Slovem bionafta jsou označovány nízkomolekulární estery vyšších mastných kyselin s nízkomolekulárním alkoholem, nejčastěji metanolem či etanolem. Surovinou pro výrobu bionafty jsou olejnate plodiny – sójový či palmový olej, olej ze slunečnice nebo řepky apod. Výroba tohoto paliva je bezodpadová technologie, olej je lisován ze suchých semen, výlisky jsou pak využívány pro výrobu krmných směsí a přírodních hnojiv. V posledních několika letech se kvůli neustále zvyšujícím se cenám olejnatých plodin hledají nové zdroje surovin, například použité fritovací oleje, odpadní živočišné tuky, aj. Aby bionaftu bylo možné použít, musí splňovat podmínky udávané evropskou normou EN 14214:2003. [19]

Nejčastějším způsobem výroby bionafty je transesterifikace olejů nízkomolekulárním alkoholem za enzymatické katalýzy. Jako alkohol je nejvíce používán metanol, eventuálně etanol. Použití ostatních alkoholů (propanol, butanol) je také možné, avšak problematické. Nejčastěji používaným enzymem je lipáza kmene *Pseudomonas cepacia*, dále pak *Rhizomucor miehei* či *Candida antarctica*. Je také možno imobilizovat celé buňky. Tato technologie snižuje náklady výroby, neboť je zcela eliminován proces purifikace. Výroba bionafty vyžaduje prostředí s nízkým obsahem vody, jelikož lipázy by ve vodném prostředí upřednostňovaly hydrolýzu oleje. Byla studována možnost přidavku dalších látek, které by zlepšovaly metanolýzu oleje, metanol má totiž inhibiční účinky a snižuje tak výtěžky celé reakce. Bylo zjištěno, že ektoin, derivát pyrimidin-4-karboxylové kyseliny, snižuje afinitu lipázy k metanolu a naopak zvyšuje její afinitu k triglyceridu. Vedlejším produktem výroby bionafty je glycerol, který je pak konvertován na 1,3-propandiol, využívaný například k výrobě polymerů. [19, 49]

Výhodou enzymaticky katalyzované výroby biodieselu jsou relativně nízké teploty reakce (25-35 °C). Nevýhodou jsou pak dlouhé reakční doby (až desítky hodin), cena enzymů a částečná ztráta aktivity v metanolu. [49]

3.4 Medicínské aplikace

S rostoucími znalostmi o působení enzymů a jejich významu se postupně rozšiřovaly také vědomosti o jejich možném využití v léčbě řady onemocnění. I když cesta k prosazení této myšlenky byla poměrně složitá, je dnes již nesporným faktem, že pomocí enzymů lze pozitivně ovlivňovat řadu nemocí a zdravotních obtíží. Použití enzymů v medicíně lze rozdělit do tří základních skupin: (1) stanovení enzymatické aktivity v krvi, (2) enzymové analytické metody a (3) léčebné podávání enzymů a enzymatických směsí.

- **Stanovení aktivity enzymů v krvi**

Stanovení lipázy v krevním séru se využívá pro diagnostiku a monitorování akutní pankreatitidy a dalších onemocnění (selhání ledvin či cirhóza). Dojde-li k poškození slinivky břišní, lipáza se do krevního oběhu dostává ve zvýšeném množství. Při laboratorním stanovení je nutno pankreatický enzym odlišit od ostatních lipolytických enzymů, které jsou v plazmě v malém množství také přítomny. Stanovení aktivity lipázy zahrnuje různé postupy - enzymové štěpení přirozeného substrátu, štěpení chromogenních a fluorogenních substrátů a metody imunologické (ELISA, latex-aglutinační metody).

Nejčastěji se používají nefelometrické a turbidimetrické postupy založené na štěpení přirozeného substrátu lipáz, triacylglycerolu, většina souprav pro enzymové stanovení lipázy pak obsahuje i kolipázu. [50]

- **Enzymové analytické metody - biosenzory**

Chemické analytické metody jsou poměrně nákladné a časově náročné. Použití mikrobiálních lipáz coby biosenzorů analýzu značně usnadňuje. Základní myšlenkou je tvorba glycerolu, který je poté oxidován glyceroldehydrogenázou a uvolněné NADH je kvantifikováno pomocí fluorescenční spektroskopie. K tomuto účelu jsou používány nespecifické lipázy, zejména pak enzymy *Candida rugosa*, které vykazují vysokou aktivitu a umožňují tak rychlé uvolňování glycerolu. Lipolytické enzymy pak lze v kombinaci s glukózaoxidázou imobilizovat na pH či kyslíkové elektrody. Tyto lipidové biosenzory jsou pak použity ke stanovení triglyceridů či cholesterolu v krvi. [42]

- **Léčebné podávání enzymů**

Lipidy jsou vedle sacharidů a proteinů základním prvkem všech tkání. Kromě funkce stavební mají i funkci zásobní a ochrannou. Esenciálním enzymem v metabolismu tuků jsou právě lipázy, které jsou produkovány ve slinivce břišní. Jejich nedostatek může mít pro organismus fatální následky. Pacienti s exokrinní pankreatickou nedostatečností jsou pak léčeni substitucí pankreatickými enzymy pocházejícími z živočišných zdrojů. Lékové formy v současné době obsahují mimo lipáz i další enzymy – amylázy a proteázy. Pankreatické enzymy musí být pacientům podávány v dostatečném množství, které je definováno množstvím lipázy. [51]

CÍLE PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo otestovat vybrané mikroorganismy s potenciálem využití při čištění odpadních vod z potravinářských provozů na produkci lipáz v přítomnosti různých zdrojů olejů, dusíku a v přítomnosti detergentu.

MATERIÁL A METODY

1 MATERIÁL

1.1 Seznam chemikálií

- destilovaná voda
- D-glukosa (Lach-ner)
- dihydrogenfosforečnan draselný KH_2PO_4 (Lach-ner)
- hovězí extrakt (Himedia Laboratories Limited)
- hydrogenuhličitan sodný $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (Lach-ner)
- hydroxid sodný (Lach-ner)
- Jar, prostředek na mytí nádobí (5 - 15 % aniontové povrchově aktivní látky, < 5 % neiontové povrchově aktivní látky, benzisothiazolinon, fenoxietanol, parfém, geraniol, limonen)
- kvasničný extrakt (Himedia Laboratories Limited)
- olivový olej
- pepton (Himedia Laboratories Limited)
- *p*-nitrofenol $\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_3$
- *p*-nitrofenyllaurát
- řepkový olej bezerukový
- chlorid amonný NH_4Cl (Lach-ner)
- síran hořečnatý heptahydrát $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Lach-ner)
- slunečnicový olej
- tributyrin (Himedia Laboratories Limited)
- uhličitan sodný Na_2CO_3 (Lach-ner)
- urea (Lach-ner)
- síran amonný $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Lach-ner)

1.2 Roztoky a kultivační média

- bazální médium (D-glukosa $30 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, hovězí extrakt $5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, NH_4Cl $2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, KH_2PO_4 $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0,3 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$)
- fosforečnanový pufr pH 7,2 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ $5,96 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, KH_2PO_4 $2,29 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$)
- minimální médium (kvasničný extrakt $5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, NH_4Cl $2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, KH_2PO_4 $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0,3 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$)
- NBG médium (pepton $75 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, kvasničný extrakt $25 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, D-glukosa $50 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$)
- *p*-nitrofenol 1 mM
- *p*-nitrofenyllaurát 2,5 mM
- Spirit Blue Agar Base (Himedia Laboratories Limited)
- uhličitan sodný Na_2CO_3 0,1M

1.3 Přístroje a pracovní pomůcky

- běžné a odměrné laboratorní sklo
- centrifuga
- laminární box AURA mini (Biotech)
- McFarlandův denzitometr DEN-1B (Laboserv s.r.o, Brno)
- mikrozkušavky
- pH metr
- pipety
- předvážky (Scaltec, USA)
- spektrofotometr UV/VIS Helios Delta (Thermospectronic, Velká Británie)
- stojan na zkumavky
- špičky
- termostat
- třepačky
- vortex

1.4 Mikroorganismy

- *Bacillus subtilis* CCM 1999
- *Geobacillus stearothermophilus* CCM 5965
- *Kluyveromyces marxianus* CCY 51-1-1
- *Rhodotorula glutinis* CCY 20-1-35
- *Rhodotorula graminis* CCY 20-14-7
- *Rhodotorula minuta* CCY 20-11-22
- *Yarrowia lipolytica* CCY 29-26-34

2 METODY

2.1 Screening lipolytické aktivity

K ověření lipolytické aktivity vybraných mikroorganismů byl použit tributyrinový test na Spirit blue agaru (SPA). Živné médium bylo připraveno a sterilizováno dle návodu výrobce, poté bylo rozlito na Petriho misky (PM). Jako substrát byl použit tributyrin v množství 30 ml na 1000 ml média. Povrchová kultivace probíhala po dobu 48 hodin při teplotách optimálních pro růst daných mikroorganismů (**Tabulka IV**). Principem je změna barvy tuhého média s obsahem barevného indikátoru při hydrolýze tributyrinu lipolytickými enzymy. Indikátor Spirit Dye tvoří s tukovou fází komplex, který je zodpovědný za matný vzhled. Lipolytické enzymy tuk rozkládají, matný vzhled tedy mizí. Pozitivní reakcí je vyjasněná zóna kolem kolonií a/nebo změna barvy kolonií. [52]

Tabulka IV Kultivační teploty jednotlivých mikroorganismů při tributyrinovém testu.

mikroorganismus	teplota [°C]
<i>Yarrowia lipolytica</i>	30
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	30
<i>Rhodotorula minuta</i>	30
<i>Rhodotorula glutinis</i>	30
<i>Rhodotorula graminis</i>	30
<i>Bacillus subtilis</i>	37
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	55

2.2 Stanovení lipolytické aktivity

Stanovení lipolytické aktivity bylo provedeno jak v supernatantu, tak v sedimentu. Principem je spektrofotometrické měření množství *p*-nitrofenolu (*p*-NF) uvolněného z *p*-nitrofenylesteru mastné kyseliny působením enzymu. Vzniká žlutě zabarvený roztok, který je poté proměřen při 420 nm. Vzorec pro výpočet aktivity enzymu vychází z rovnice lineární regrese získané vyhodnocením kalibrační křivky *p*-NF (1).

$$a = \frac{A_{420} + d}{c \cdot V \cdot t} \quad (1)$$

kde

a lipolytická aktivita enzymu [$\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1} = \text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$]

A₄₂₀ absorbance vzorků

t doba inkubace vzorku s enzymem [min]

V objem enzymu [ml]

c, d koeficienty z rovnice regresní přímky $A = cx + d$, kde A je absorbance, x je molární množství *p*-NFL

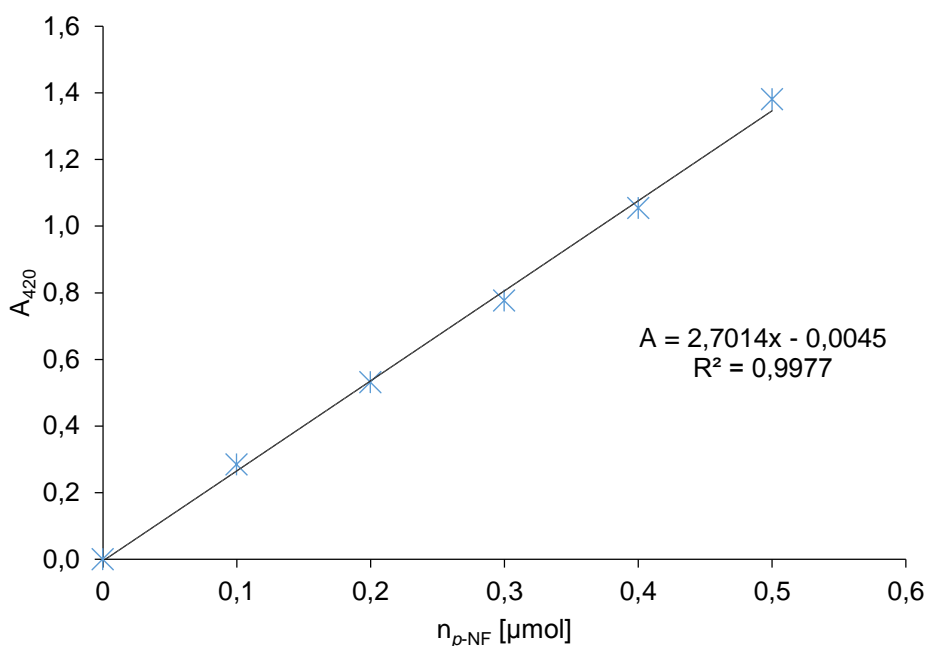
Enzym má aktivitu 1 jednotku [U], pokud dojde k uvolnění 1 μmol *p*-nitrofenolu za 1 minutu, za definovaných podmínek. Aktivita byla stanovována na ml živného média.

2.2.1 Stanovení kalibrační křivky *p*-nitrofenolu

Z roztoku *p*-NF o koncentraci 1,0 mM ($\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$) byla připravena sada kalibračních bodů o koncentraci 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 a 0,5 μmol . K roztokům bylo přidáno 650 μl fosfátového pufru o koncentraci 50 mM a pH 7,2. Obsah byl promíchán a inkubován při 37°C po dobu 30 minut. Následně bylo přidáno 0,1 ml 0,1M Na_2CO_3 a spektrometricky byla proměřena absorbance při 420 nm. Složení jednotlivých bodů kalibrační řady je shrnuto v **Tabulka V**, kalibrační přímka s rovnicí regrese je znázorněna v **Graf 1**.

Tabulka V Složení jednotlivých bodů kalibrační řady.

složka [μl]	blank	1	2	3	4	5
<i>p</i> -NF	0	20	40	60	80	100
fosfátový pufr	650	650	650	650	650	650
voda	100	80	60	40	20	0
Na_2CO_3	100	100	100	100	100	100
$n_{p\text{-NF}}$ [μmol]	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5



Graf 1 Kalibrační přímka *p*-nitrofenolu.

2.2.2 Stanovení v supernatantu

Z kultivačního média bylo v jednotlivých časových intervalech odebráno 0,5 ml buněčné suspenze, která byla následně centrifugována při 13 000 ot/min a teplotě 4°C po dobu 5 minut. Ze supernatantu bylo odebráno 50 µl vzorku (enzymu), k němuž bylo poté přidáno 650 µl fosfátového pufru a 50 µl substrátu. Jako substrát byl použit roztok *p*-nitrofenyllaurátu (*p*-NFL, C12:0) v etanolu. Reakční směs byla homogenizována a inkubována v termostatu při 37°C po dobu 30 minut. Poté bylo ke směsi přidáno 100 µl 0,1M Na₂CO₃. Směs byla opět promíchána a při 420 nm byla změřena absorpce reakční směsi. Jako blank byl použit vzorek, který místo substrátu obsahoval stejné množství destilované vody.

2.2.3 Stanovení v sedimentu

Ke stanovení byl použit sediment, který zůstal ve zkumavce po odběru vzorku k předchozímu stanovení a odlití zbytkového supernatantu. Sediment byl promyt a centrifugován při 13 000 ot/min při 4 °C. Poté byl sediment rozsuspendován v 700 µl fosfátového pufru a bylo přidáno 50 µl *p*-NFL. Reakční směs byla homogenizována a inkubována v termostatu při 37°C po dobu 30 minut. Následně bylo ke směsi přidáno 100 µl 0,1M Na₂CO₃. Po ukončení reakce byla směs centrifugována při 13 000 ot/min při 4°C. Absorpce získaného supernatantu byla poté proměřena při 420 nm. Jako blank byl použit vzorek, který místo substrátu obsahoval stejné množství destilované vody.

2.2.4 Stanovení růstové křivky

Stanovení růstové křivky jednotlivých mikrobiálních kultur probíhalo za použití McFarlandova denzitometru. Princip měření je založen na měření optické absorpce s digitálním zobrazením výsledku v McFarlandových jednotkách (0 – 19,5) na displeji přístroje. Denzitometr je určen pro měření zákalu v rozsahu 0,3 – 5,0 McFarlanda (100x10⁶ – 150x10⁷ buněk·ml⁻¹). Tento přístroj může měřit i v širším rozsahu (5,0 – 15,0 McFarlanda), avšak v tomto případě se musí počítat s vyšší odchylkou. Zákal byl proměřován v časových intervalech, které byly shodné s intervaly odběru vzorků ke stanovení lipolytické aktivity.

VÝSLEDKY A DISKUZE

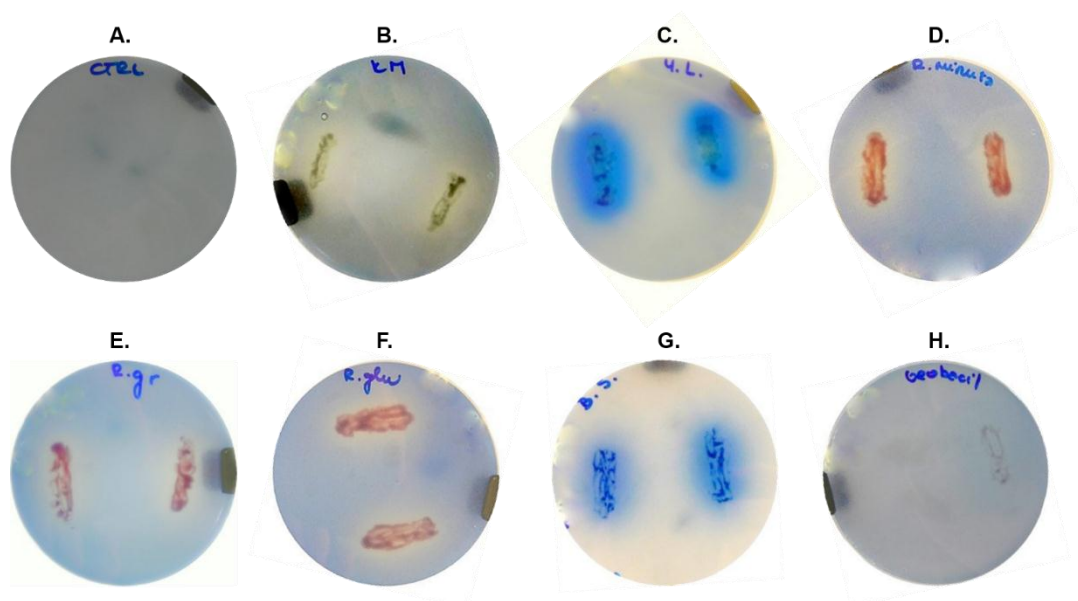
Na základě literární rešerše (viz **2 Lipolytické mikroorganismy**) bylo vybráno sedm potenciálně lipolytických mikroorganismů – pět kvasinek (*Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces marxianus*, *Rhodotorula minuta*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula graminis*) a dvě bakterie (*Bacillus subtilis* a termostabilní *Geobacillus stearothermophilus*).

Byla testována produkce lipolytických enzymů v přítomnosti sacharidového (glukóza) a lipidového (rostlinný olej) zdroje uhlíku. Na základě výsledků pak byly vybrány dva mikroorganismy, *Yarrowia lipolytica* a *Rhodotorula minuta*, které byly dále testovány. *Yarrowia lipolytica* je velmi dobře prostudovaným mikroorganismem z hlediska produkce lipáz, zatímco o kvasince *Rhodotorula minuta* a její lipolytické aktivitě je dostupných jen velmi málo informací.

1 SCREENING VYBRANÝCH MIKROORGANISMŮ

U vybraných mikrobů byla schopnost rozkládat lipidy ověřena kultivačně na Petriho miskách se Spirit blue agarem s obsahem tributyrinu, tzv. tributyrinovým testem. Pozitivní reakce, a tedy schopnost metabolizovat tributyrin, byla pozorována u všech mikroorganismů, s výjimkou *Geobacillus stearothermophilus*. U mikroorganismů s lipolytickou aktivitou došlo k vytvoření jasné zóny okolo kolonií nebo ke změně barvy okolí či samotných kolonií (**Obrázek 4 B-H**). U bakterie *Bacillus subtilis* (**4F**) a kvasinky *Yarrowia lipolytica* (**4B**) byla změna detekována již po 16 hodinách kultivace, u zbývajících kvasinek byla pozitivní reakce pozorována po 48 hodinách kultivace.

Na základě makroskopického screeningu bylo k dalším testům použito 6 mikroorganismů s prokázanou lipolytickou aktivitou - *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces marxianus*, *Rhodotorula minuta*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula graminis* a *Bacillus subtilis*.



Obrázek 4 Tributyrinový test. (A) kontrolní miska, (B) *Kluyveromyces marxianus*, (C) *Yarrowia lipolytica*, (D) *Rhodotorula minuta*, (E) *Rhodotorula glutinis*, (F) *Rhodotorula graminis*, (G) *Bacillus subtilis*, (H) *Geobacillus stearothermophilus*.

2 VLIV PŘÍTOMNOSTI LIPIDICKÉHO ZDROJE UHLÍKU NA RŮST A PRODUKCI LIPÁZ

U vybraných mikroorganismů byla lipolytická aktivita testována v médiích obsahujících následující zdroje uhlíku lipidového či sacharidového charakteru a jejich kombinace: (1) glukóza, (2) glukóza a řepkový olej a (3) řepkový olej. Lipolytická aktivita byla sledována jak v supernatantu, tak v sedimentu. V průběhu kultivace byla sledována také růstová křivka, která sloužila ke stanovení celkového nárůstu buněk v závislosti na složení kultivačního média. Výsledky jsou graficky znázorněny v **Grafech 2-9**.

2.1 Médium s glukózou

Lipolytické aktivity sledovaných mikroorganismů dosahovaly nejvyšších hodnot v prvních 24 hodinách kultivace, tzn. během lag-fáze a fáze exponenciální (**Grafy 2-7**). Poté produkce enzymů poklesla. Výjimkou byly lipázy *Bacillus subtilis*, jejichž produkce s nástupem stacionární fáze opět narůstala. Literatura uvádí, že bakteriální lipolytické enzymy jsou produkovány a vylučovány do prostředí zejména na konci exponenciální fáze a částečně ve fázi stacionární. Výsledky *Bacillus subtilis* se tak s těmito daty shodují pouze z části (produkce lipáz ve fázi stacionární). [53]

Nejvyšší lipolytická aktivity byla pozorována u všech sledovaných mikroorganismů v supernatantu v čase odběru 9 hodin. Nejvyšší aktivity v tomto čase vykazovala bakterie *Bacillus subtilis* ($0,539 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$) a kvasinka *Rhodotorula glutinis* ($0,991 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$), aktivity ostatních mikroorganismů oscilovaly kolem hodnoty $0,3 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$. V časech mezi 48 hodinami a 96 hodinami, tedy ve fázi stacionární aktivity žádného mikroba nepřesáhla hodnotu $0,1 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$. Lipolytická aktivita v sedimentu byla vzhledem k aktivitě v supernatantu minimální, lze tedy říci, že lipázy jsou sekretovány do extracelulárního prostředí a nejsou vázány na buněčnou hmotu.

Studie uvádí, že extracelulární lipázy kvasinky *Yarrowia lipolytica* jsou převážně vázané na buňku a do prostředí jsou uvolňovány na konci růstové fáze. [37] Data naměřená při kultivaci *Y. lipolytica* jsou však s tímto tvrzením v rozporu, neboť ukazují, že lipázy jsou uvolňovány do média na začátku kultivace s maximem na počátku exponenciální fáze.

2.2 Médium s glukózou a olejem

Aby bylo možné zjistit, jak je tvorba lipolytických enzymů ovlivněna přítomností lipidového zdroje uhlíku, byl do média přidán řepkový olej v množství 3 % celkového objemu kultivačního média.

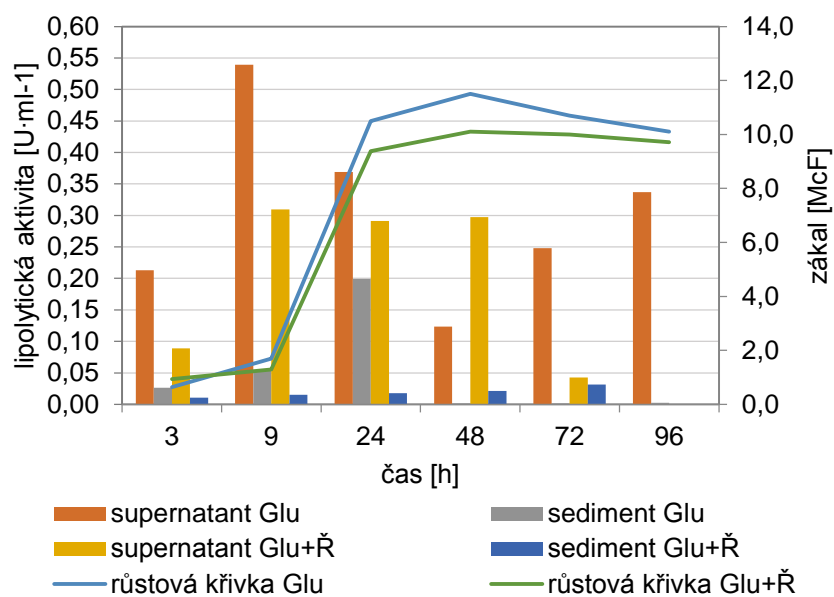
Bylo pozorováno, že přidavek oleje ve srovnání s médiem obsahujícím jako zdroj uhlíku pouze glukózu produkci extracelulárních lipolytických enzymů nezvyšuje, naopak produkce je snížena (**Grafy 2-7**). Sekrece lipáz *B. subtilis*, *K. marxianus*, *R. minuta*, *R. glutinis* a *R. graminis* je však s nástupem exponenciální fáze víceméně konstantní v dalším průběhu kultivace.

V průběhu kultivace kvasinky *Y. lipolytica* lze pozorovat nárůst tvorby lipáz v 9. hodině, pak průběžný pokles jejich produkce. Výsledky *Y. lipolytica* však nekorelují s výsledky Najjar et al. [39], kteří pozorovali útlum produkce lipáz až do chvíle, kdy byla glukóza z média spotřebována a teprve poté došlo ke zvýšení produkce lipáz.

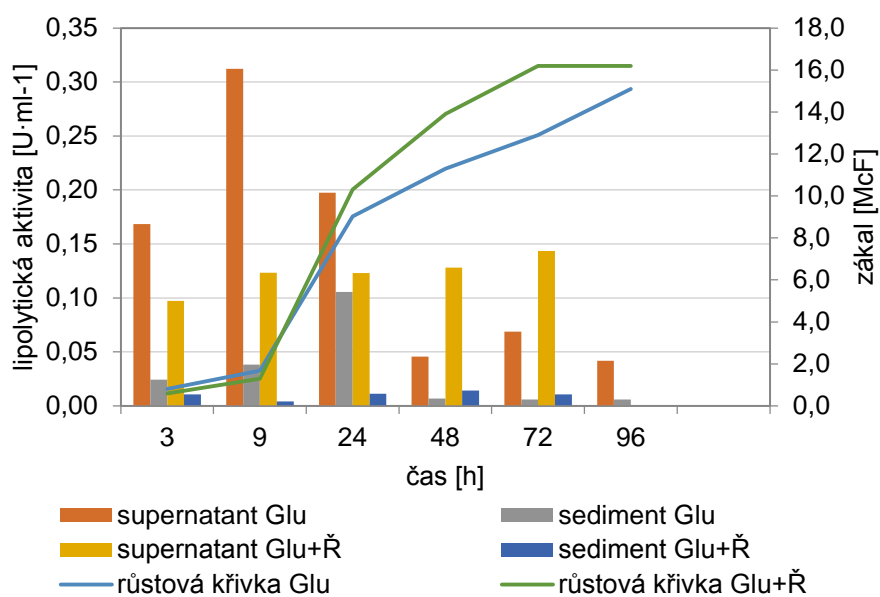
Růstová křivka kultivace v přítomnosti glukózy i řepkového oleje naznačuje nárůst biomasy *R. minuta*, *R. glutinis*, *R. graminis* i *Y. lipolytica* (zvýšení v průměru o 2 stupně McFarlanda). Tyto výsledky korelují s daty Kebabci et al. [54] a Najjar et al. [39], které nevykazují zvýšenou produkci lipáz v přítomnosti oleje i glukózy, avšak zaznamenávají vyšší nárůst buněčné hmoty.

Množství biomasy *B. subtilis* a *K. marxianus* se nemění. U posledního jmenovaného mikroorganismu lze pouze pozorovat rychlejší nástup a ukončení exponenciální fáze.

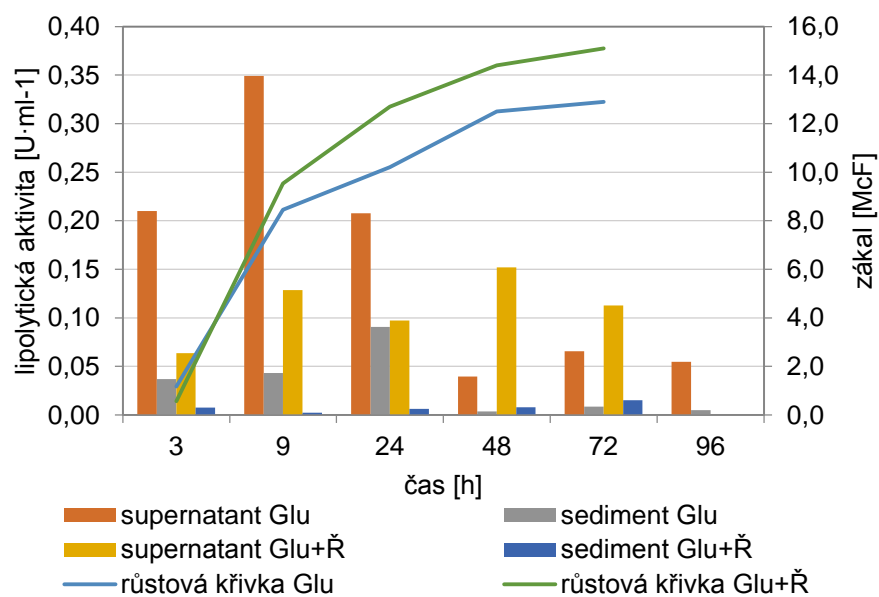
Na základě těchto výsledků lze usoudit, že produkce lipolytických enzymů není striktně indukována pouze přítomností lipidického substrátu, ale jejich tvorba je ovlivněna i přítomností substrátu nelipidického charakteru. Data z kultivací některých mikrobů (*Rhodotorula minuta*, *Rhodotorula graminis* a *Kluyveromyces marxianus*) naznačují simultánní využití obou zdrojů uhlíku v počátcích růstu, avšak s vyčerpáním sacharidu dochází k indukci tvorby lipolytických enzymů a využívání lipidického zdroje.



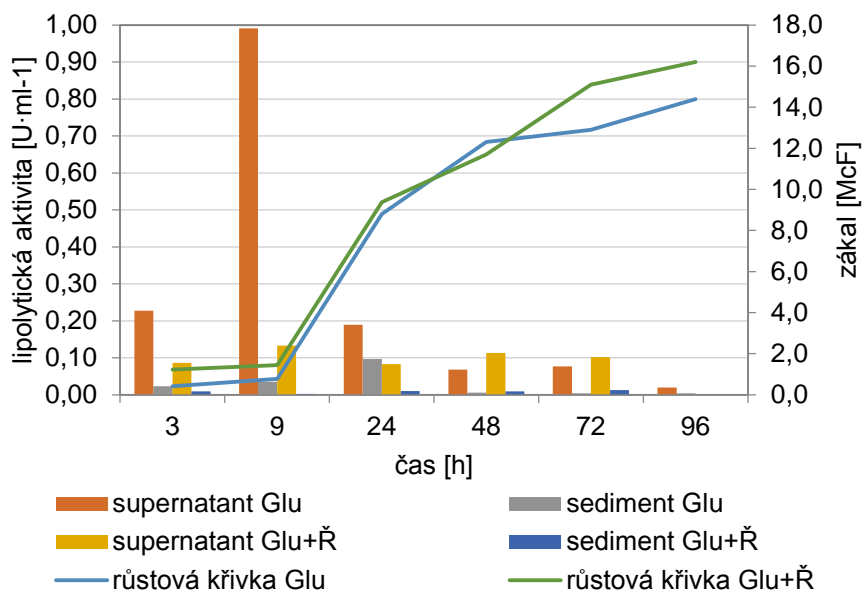
Graf 2 *Bacillus subtilis* - srovnání průběhu produkce lipolytických enzymů a růstové křivky během kultivace. Glu – glukóza, Ř – řepkový olej.



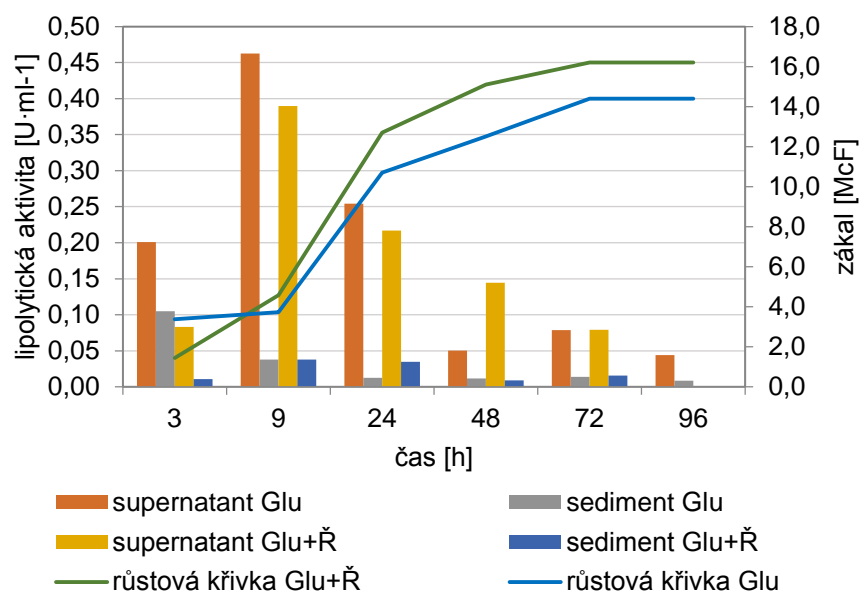
Graf 3 *Rhodotorula minuta* - srovnání průběhu produkce lipolytických enzymů a růstové křivky během kultivace.



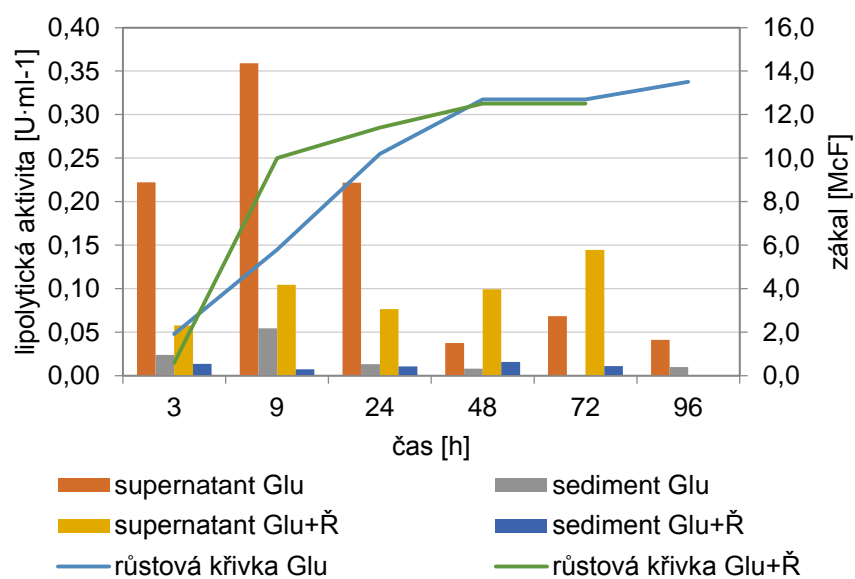
Graf 4 *Rhodotorula graminis* - srovnání průběhu produkce lipolytických enzymů a růstové křivky během kultivace.



Graf 5 *Rhodotorula glutinis* - srovnání průběhu produkce lipolytických enzymů a růstové křivky během kultivace.



Graf 6 *Yarrowia lipolytica* - srovnání průběhu produkce lipolytických enzymů a růstové křivky během kultivace.



Graf 7 *Kluyveromyces marxianus* - srovnání průběhu produkce lipolytických enzymů a růstové křivky během kultivace.

2.3 Médium s olejem

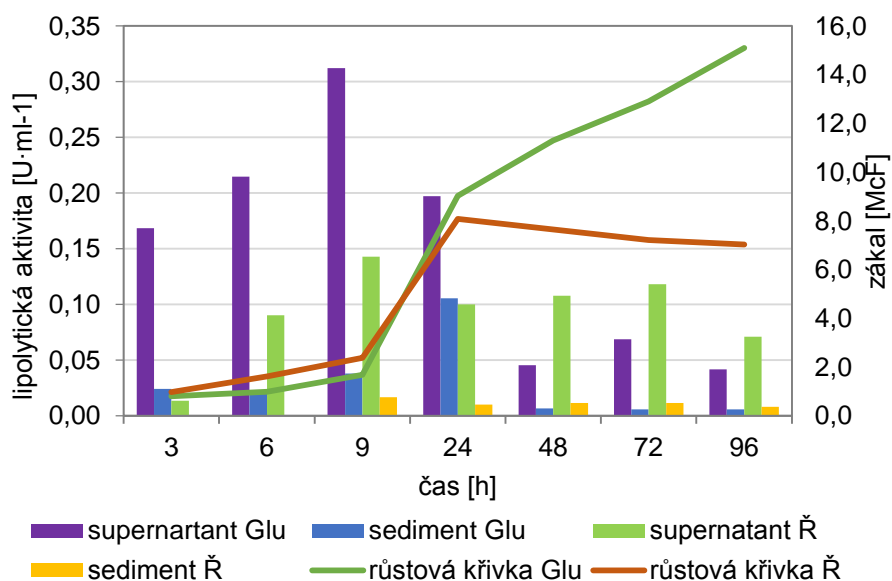
K dalším experimentům byly použity mikroorganismy *Yarrowia lipolytica* a *Rhodotorula minuta*.

Nejprve byla zkoumána reakce mikroorganismů na přítomnost oleje jako jediného zdroje uhlíku. Současně bylo měřeno i pH kultivačního média.

- ***Rhodotorula minuta***

Celkový nárůst biomasy *Rhodotorula minuta* v médiu s olejem je téměř dvojnásobně nižší ve srovnání s médiem s glukózou, avšak průběh růstové křivky (počátek i ukončení exponenciální fáze) je až do 24. hodiny totožný (**Graf 8**). Stejně tak průběh hodnot lipolytických aktivit v jednotlivých intervalech kopíruje v prvních 24 hodinách růstu trend průběhu aktivit v médiu s glukózou, avšak hodnoty jsou nižší. Poté však nenastává výrazné utlumení produkce lipáz, jako je tomu v přítomnosti glukózy, ale dochází ke stabilizaci produkce, a až v 96. hodině k jejímu poklesu. Aktivita lipáz v sedimentu v médiu s řepkovým olejem je mezi 9. a 96. hodinou konstantní, avšak je minimální (hodnoty nepřesahují $0,02 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$).

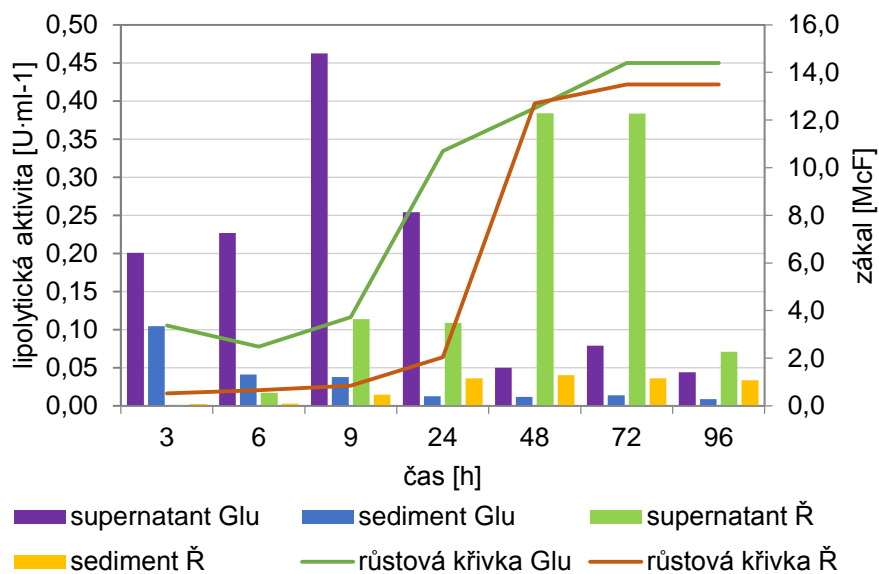
Produkce lipáz *Rhodotorula minuta* tak zřejmě není indukována přítomností lipidu ve smyslu zvýšení tvorby těchto enzymů. Jelikož v odborné literatuře nejsou k dispozici žádné informace o produkci lipáz *R. minuta*, nelze tyto poznatky porovnat.



Graf 8 Průběh produkce lipolytických enzymů a růstových křivek *Rhodotorula minuta* v médiu s glukózou či olejem, jako jedinými zdroji uhlíku. Glu – glukóza, Ř – řepkový olej.

- ***Yarrowia lipolytica***

U kvasinky *Yarrowia lipolytica* (**Graf 9**) bylo pozorováno, že dochází k posunutí počátku exponenciální fáze do pozdějších časů (do 24. hodiny). Celkový nárůst biomasy je ve srovnání s médiem, kde je jako jediný zdroj uhlíku glukóza, menší o 1 jednotku McFarlanda. Výrazné je posunutí maximálních hodnot lipolytické aktivity. Maxima hodnot aktivity nastávají v médiu s olejem v časech 48 a 72 hodin, tedy ve stacionární fázi a pohybují se kolem hodnoty $0,4 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$, zatímco nejvyšší produkce lipáz v médiu s glukózou nastává v počátcích kultivace.



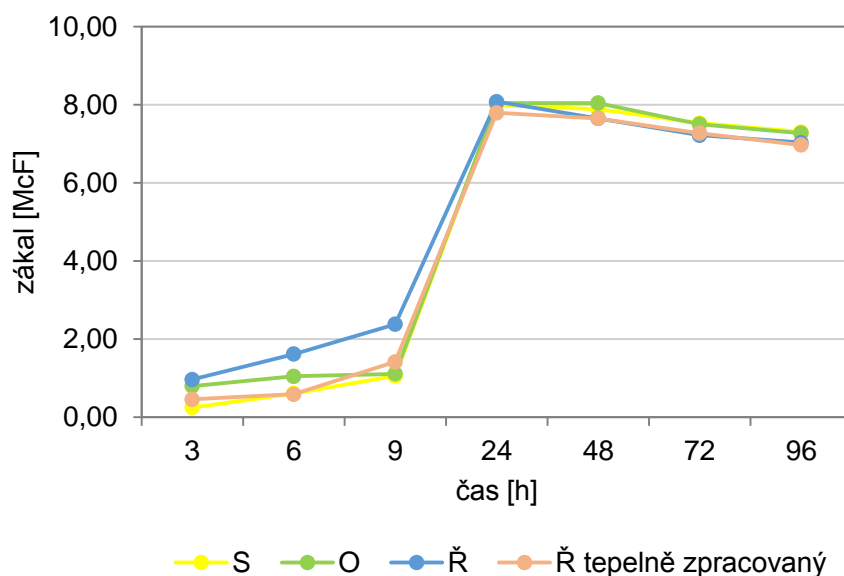
Graf 9 Průběh produkce lipolytických enzymů a růstových křivek *Yarrowia lipolytica* v médiu s glukózou či řepkovým olejem, jako jedinými zdroji uhlíku.

3 VLIV RŮZNÝCH LIPIDOVÝCH SUBSTRÁTŮ NA RŮST MIKROORGANISMŮ A PRODUKCI LIPÁZ

Dalším krokem studia produkce lipáz mikroorganismy *Rhodotorula minuta* a *Yarrowia lipolytica* bylo zkoumání vlivu různých druhů rostlinných olejů na produkci lipáz. Kromě řepkového oleje byly jako jediný zdroj uhlíku použity také olej slunečnicový, olivový a tepelně zpracovaný řepkový olej, použitý při přípravě smažených jídel. Tyto oleje jsou v potravinářských provozech běžně používány. Do kultivačního média byly přidány v množství 3 % celkového objemu kultivačního média. Měřena byla i změna pH média v průběhu kultivace.

- ***Rhodotorula minuta***

Růstové křivky v přítomnosti všech druhů olejů mají totožný průběh (**Graf 10**). Maximální množství buněčné hmoty bylo v médiu na konci exponenciální fáze ve 24. hodině kultivace, a to 8 jednotek McFarlanda. Počátek exponenciální fáze je u v přítomnosti všech testovaných zdrojů uhlíku 9. hodině kultivace, fáze stacionární pak nastává v 24. hodině.



Graf 10 Růstové křivky *Rhodotorula minuta* v přítomnosti vybraných druhů olejů.

S - slunečnicový olej, O – olivový olej, Ř – řepkový olej, ŘP – řepkový olej, tepelně zpracovaný.

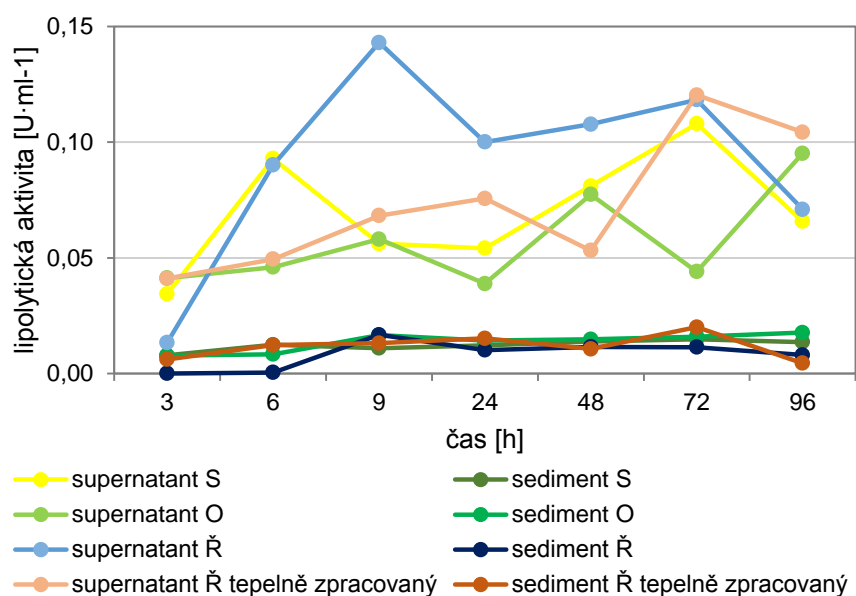
V přítomnosti řepkového oleje lze sledovat nárůst aktivity v prvních 9 hodinách kultivace, mezi 24. a 72. hodinou lipolytická aktivita pozvolna stoupá a poté opět klesá (**Graf 11**). Ve srovnání s ostatními oleji je vzestup produkce lipáz v přítomnosti řepkového oleje nejrychlejší a lipolytická aktivita je v průběhu celé kultivace nejvyšší (maximum produkce $0,14 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$ v 9. hodině kultivace).

Produkce lipáz v přítomnosti slunečnicového oleje je celkově nižší, svých maxim dosahuje v 6. a 72. hodině ($0,09 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$, respektive $0,108 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$), avšak trend průběhu aktivity je stejný jako u oleje řepkového. Lze pozorovat nárůst v lag-fázi (mezi 3. a 9. hodinou) a ve fázi zpomalení růstu a fázi stacionární (24. až 96. hodina kultivace), zatímco ve fázi exponenciální (9. až 24. hodina kultivace) dochází k útlumu produkce lipolytických enzymů.

V přítomnosti tepelně opračovaného řepkového oleje lze pozorovat pozvolné zvyšování tvorby lipáz během prvních 24. hodin kultivace (lag-fáze a fáze exponenciální), maxima je pak dosaženo ve fázi stacionární mezi 72. a 96. hodinou (stejně jako u oleje slunečnicového).

V přítomnosti olivového oleje lze v průběhu exponenciální fáze pozorovat profil lipolytické aktivity shodný s ostatními oleji - během exponenciální fáze, tedy mezi 9. a 24. hodinou dochází k poklesu tvorby lipáz, s počátkem fáze stacionární však produkce opět roste, a v 96. hodině, tedy při ukončení kultivace, dosahuje svého maxima ($0,095 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$). Tímto se kultivace v přítomnosti olivového oleje odlišuje od ostatních lipidických substrátů.

Lipolytickou aktivitu vázanou na buňky lze v přítomnosti všech druhů olejů označit jako zanedbatelnou, jelikož během kultivace nepřekročila hodnotu $0,02 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$.



Graf 11 Průběh produkce lipolytických enzymů *Rhodotorula minuta* ve vybraných olejích.

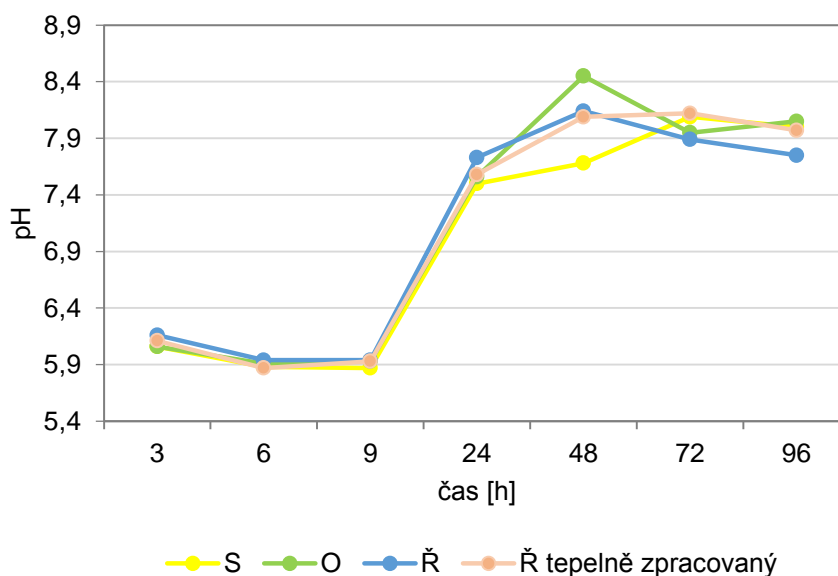
Jako nejvhodnější zdroj uhlíku k produkci lipáz se tak jeví řepkový olej. Lipázy *Rhodotorula minuta* mohou upřednostňovat nenasycené mastné kyseliny (mono- i polyenové), které jsou v řepkovém oleji nejvíce zastoupeny (**Tabulka VI**). Lze tedy usoudit, že s rostoucím obsahem nasycených mastných kyselin v oleji klesá produkce lipolytických enzymů *Rhodotorula minuta*. Tyto výsledky se shodují se závěry, které vyvodili Lakshmi et al. [16] při studiu produkce lipáz *Candida rugosa*.

K maximální produkci lipáz pak dochází v lag- fázi, fáze exponenciální je naopak ve znamení útlumu produkce lipolytických enzymů.

Tabulka VI Zastoupení mastných kyselin ve vybraných olejích (% celkového množství mastných kyselin, u hlavních mastných kyselin je uvedena průměrná hodnota). [55]

olej	mastné kyseliny							
	nasycené			mononenasycené		polynenasycené		
	palmitová C16:0	stearová C18:0	celkem nasycených	olejová C18:1	monoenové celkem	linolová C18:2	linolenová C18:3	polyenové celkem
řepkový bezerukový	4,5	1,5	5-10	56	52-76	21	10	22-40
slunečnicový	3-5	3-5	9-17	70-87	13-41	3-20	0	42-74
olivový	11,5	2,5	8-26	74	54-87	9,5	1	4-22

Měření změny pH v průběhu kultivace ukázalo u všech vybraných olejů totožný průběh pH média až do 24. hodiny, tedy do konce exponenciální fáze (**Graf 12**). V lag-fázi pH pokleslo z průměrné hodnoty 6,1 na 5,9. Ve fázi exponenciální pak hodnoty stouply průměrně na 7,6. Nárůst pH v této fázi koreluje s utlumením lipolytické aktivity v přítomnosti všech vybraných olejů. Hodnota pH roste nejpomaleji v přítomnosti slunečnicového oleje, což se shoduje s nárůstem lipolytické aktivity v tomto časovém úseku, a tedy vyšší mírou degradace lipidů na mastné kyseliny. Nejvyšší hodnoty pH bylo dosaženo v médiu s olivovým olejem, a to hodnoty 8,45. Od 72. hodiny do ukončení kultivace pak pH výrazněji neklesalo, ani nerostlo.



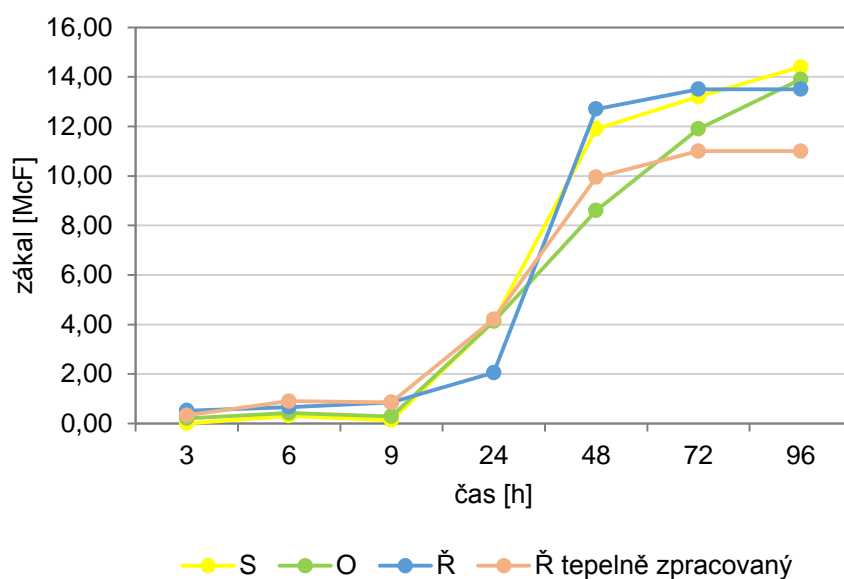
Graf 12 Změna pH kultivačního média v přítomnosti vybraných olejů při kultivaci *Rhodotorula minuta*.

- ***Yarrowia lipolytica***

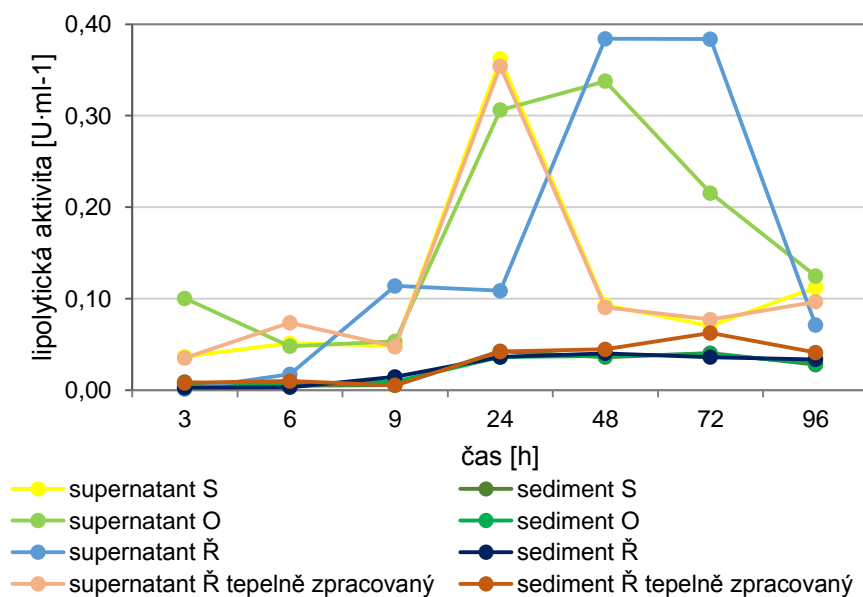
V přítomnosti všech druhů olejů byly zaznamenán totožný průběh produkce lipolytických enzymů – v exponenciální fázi, tedy mezi 9. a 48. hodinou kultivace (**Graf 13**), došlo ke vzrůstu lipolytické aktivity (**Graf 14**), ve fázi stacionární (mezi 48. a 96. hodinou) množství produkovaných enzymů v pokleslo či bylo udržováno na konstantní hladině.

Nejvýraznější nárůst aktivity byl pozorován s médiu s obsahem oleje řepkového, maximální hodnoty lipolytické aktivity bylo dosaženo v čase 48 hodin a na hodnotě $0,384 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$ byla udržena až do 72. hodiny. Poté lze v produkci lipáz pozorovat pokles. Nejmenší hodnota lipolytické aktivity pak byla zaznamenána v přítomnosti oleje olivového, a to $0,338 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$ v 48. hodině kultivace. Profily enzymových aktivit v médiích s obsahem olejů slunečnicového a tepelně zpracovaného řepkového oleje jsou pak téměř totožné, maxima – $0,362 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$, resp. $0,354 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$ bylo dosaženo v průběhu exponenciální fáze ve 24. hodině kultivace.

Mezi maximálními hodnotami lipolytických aktivit v přítomnosti jednotlivých druhů olejů nejsou výrazné rozdíly, všechny hodnoty se pohybují v intervalu 0,33 až $0,38 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$. Tato data potvrzují výsledky Kebabci et al. [54], kteří také nepozorovali rozdíly v produkci lipáz v přítomnosti stejných druhů olejů.



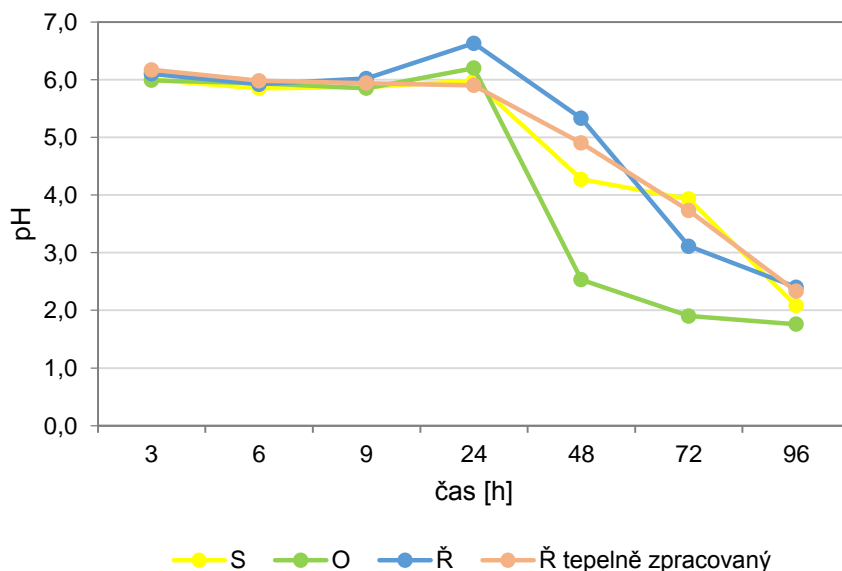
Graf 13 Růstové křivky *Yarrowia lipolytica* v přítomnosti vybraných druhů olejů.



Graf 14 Lipolytická aktivita *Yarrowia lipolytica* ve vybraných olejích.

Důkazem intenzivního štěpení lipidových substrátů je pokles pH ve druhé polovině exponenciální fáze a v průběhu fáze stacionární (**Graf 15**). Hodnoty pH pak v dalších fázích stále klesají, a to až k hodnotám kolem 2,0.

Degradace lipidů probíhá nejrychleji v médiu s olivovým olejem, kdy lze pozorovat strmý pokles pH právě ve druhé půli exponenciální fáze. S útlumem produkce lipolytických enzymů v časovém úseku od 48. do 72. hodiny pak klesá také rychlost změny pH.



Graf 15 Změna pH kultivačního média v přítomnosti vybraných olejů při kultivaci *Yarrowia lipolytica*.

Nejvhodnějším lipidickým substrátem pro produkci lipáz *Rhodotorula minuta* a *Yarrowia lipolytica* jsou tedy řepkový a olivový olej, a to nejspíše kvůli vysokému obsahu monoenoových C18:n mastných kyselin a nízkému obsahu nasycených mastných kyselin. Ve zvýšené míře je zřejmě produkována *lip2p*, která je specifická právě vůči mononenasyceným mastným kyselinám. Klíčovým faktorem její produkce je obsah kyseliny olejové v lipidickém substrátu. Tuto podmínku splňují všechny použité oleje, největší množství kyseliny olejové a zároveň nejméně nasycených mastných kyselin obsahuje právě olej řepkový (viz **Tabulka VI**). [37, 39]

Tyto výsledky potvrzují také Hadeball et al. [56], kteří zaznamenali indukční účinky kyseliny linolové na produkci lipáz *Y. lipolytica*.

Naměřené hodnoty pH kultivačního média během kultivace *Yarrowia lipolytica* měly očekávaný průběh – byl pozorován pokles pH, způsobený štěpením lipidů na mastné kyseliny. Výsledky měření pH média při kultivaci *Rhodotorula minuta* se od předpokládaného průběhu (snižování pH v důsledku štěpení lipidů na mastné kyseliny) lišily. Tyto výsledky však nelze porovnat s informacemi z literatury, neboť měření podobného charakteru nebyla prováděna.

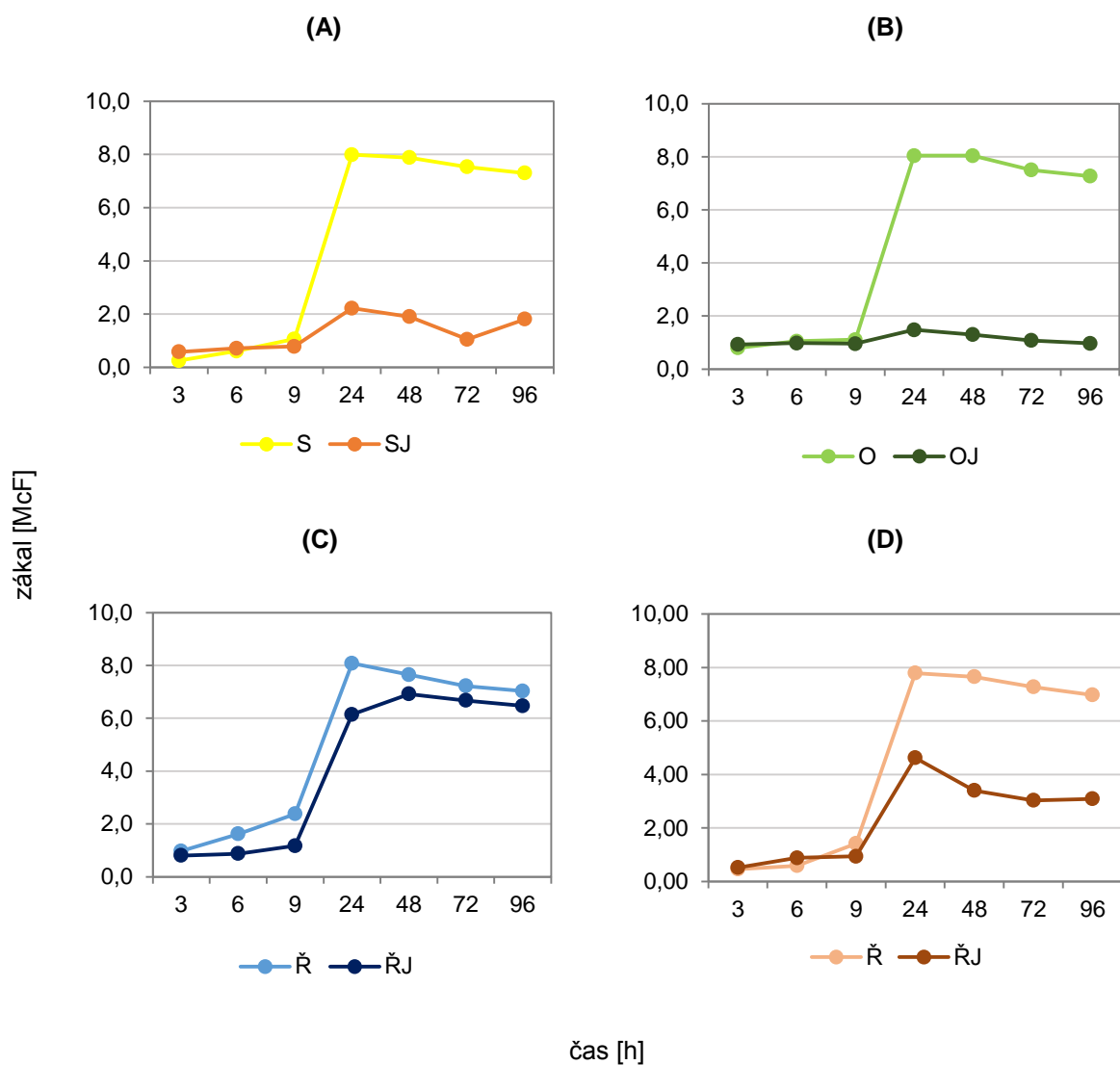
4 VLIV PŘÍTOMNOSTI DETERGENTU NA RŮST MIKROORGANISMŮ A PRODUKCI LIPÁZ

V další části studia produkce lipáz byl testován vliv přídavku detergentu do médií s vybranými oleji. Důvodem byla lepší dispergace oleje v médiu, a tedy zpřístupnění substrátu lipolytickým enzymům. V tomto experimentu byl použit běžně dostupný a běžně používaný detergenční přípravek k mytí nádobí Jar (viz **Materiál**). Do média byl přidán v množství 50 μ l na 10 ml kultivačního média.

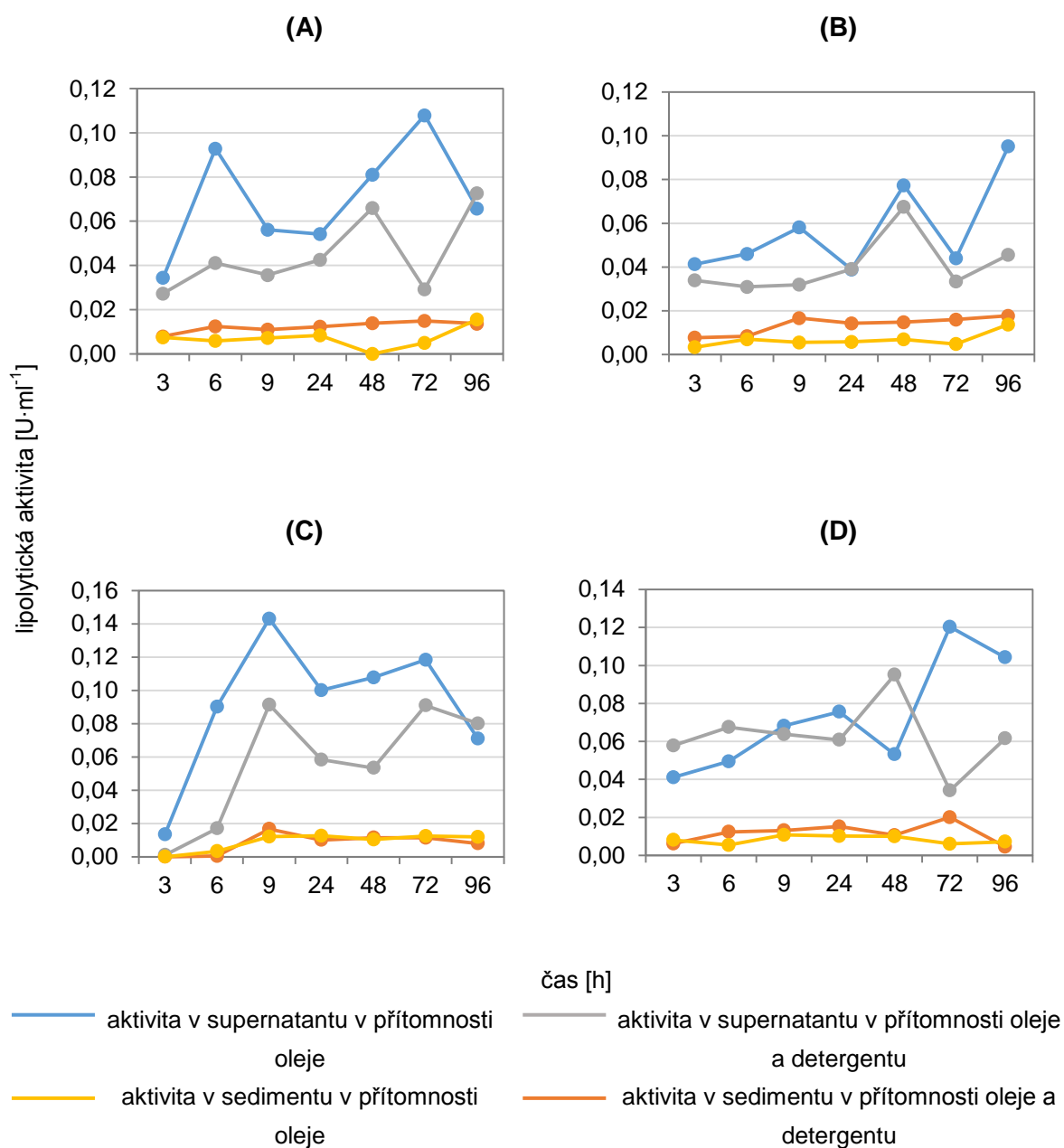
- ***Rhodotorula minuta***

Růstové křivky *Rhodotorula minuta* v přítomnosti oleje a detergentu vykazují oproti křivkám pouze v přítomnosti oleje celkový nižší nárůst buněčné hmoty (**Graf 16**). Počátek exponenciální fáze je shodný - nastává v 9. hodině kultivace a trvá do 24. hodiny. Nejvyšší nárůst biomasy byl zaznamenán v přítomnosti detergentu s řepkovým olejem a s tepelně zpracovaným řepkovým olejem (7 jednotek McFarlanda, respektive 4,6 jednotek McFarlanda). Nárůst biomasy během kultivace ve zbývajících případech nepřesáhnul hodnotu 2,3 McF.

Lipolytická aktivita u žádného z testovaných olejů nepřekročila hodnotu 0,1 U·ml⁻¹ (**Graf 17**). V přítomnosti všech druhů olejů, s výjimkou tepelně zpracovaného řepkového oleje, kopíruje křivka aktivity v přítomnosti detergentu profil lipolytické aktivity v médiu bez detergentu. Aktivita enzymů roste v lag-fázi a na počátku stacionární fáze, útlum nastává ve fázi exponenciální. Pouze v případě kombinace přepáleného řepkového oleje a detergentu je trend přesně opačný – aktivita stagnuje mezi 6. a 9. hodinou (lag-fáze až fáze exponenciální), poté ve fázi zpomalení růstu stoupá (24. až 48. hodina), opět klesá ve fázi stacionární mezi 48. a 72. hodinou, a opětovně roste v pozdní době kultivace. Aktivita v sedimentu je zanedbatelná.



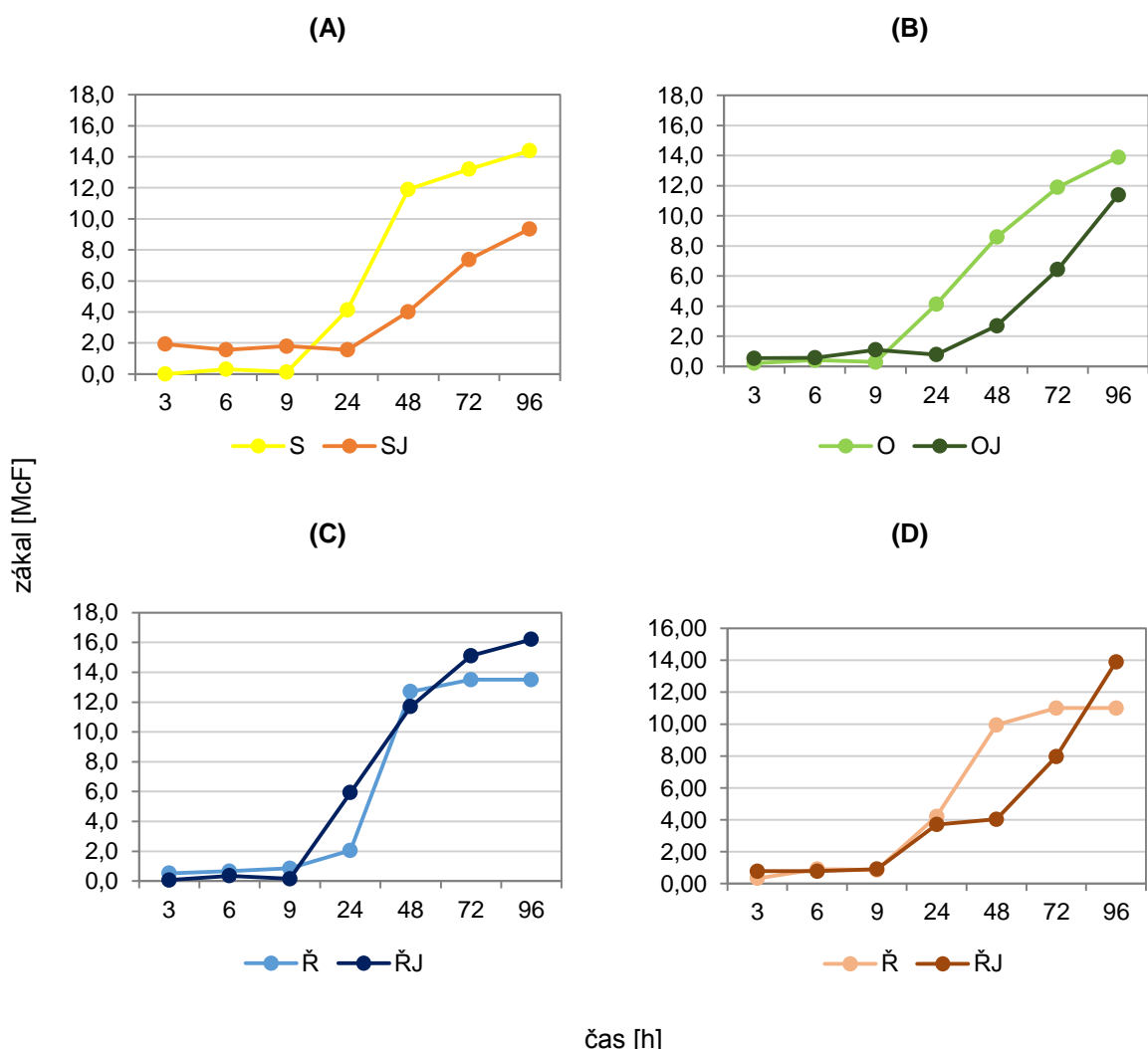
Graf 16 Srovnání růstových křivek *Rhodotorula minuta* v přítomnosti vybraných olejů a detergentu. (A) slunečnicový olej, (B) olivový olej, (C) řepkový olej, (D) řepkový olej, tepelně zpracovaný.



Graf 17 Průběh lipolytických aktivit *Rhodotorula minuta* v přítomnosti oleje a detergentu. (A) slunečnicový olej, (B) olivový olej, (C) řepkový olej, (D) řepkový olej, tepelně zpracovaný.

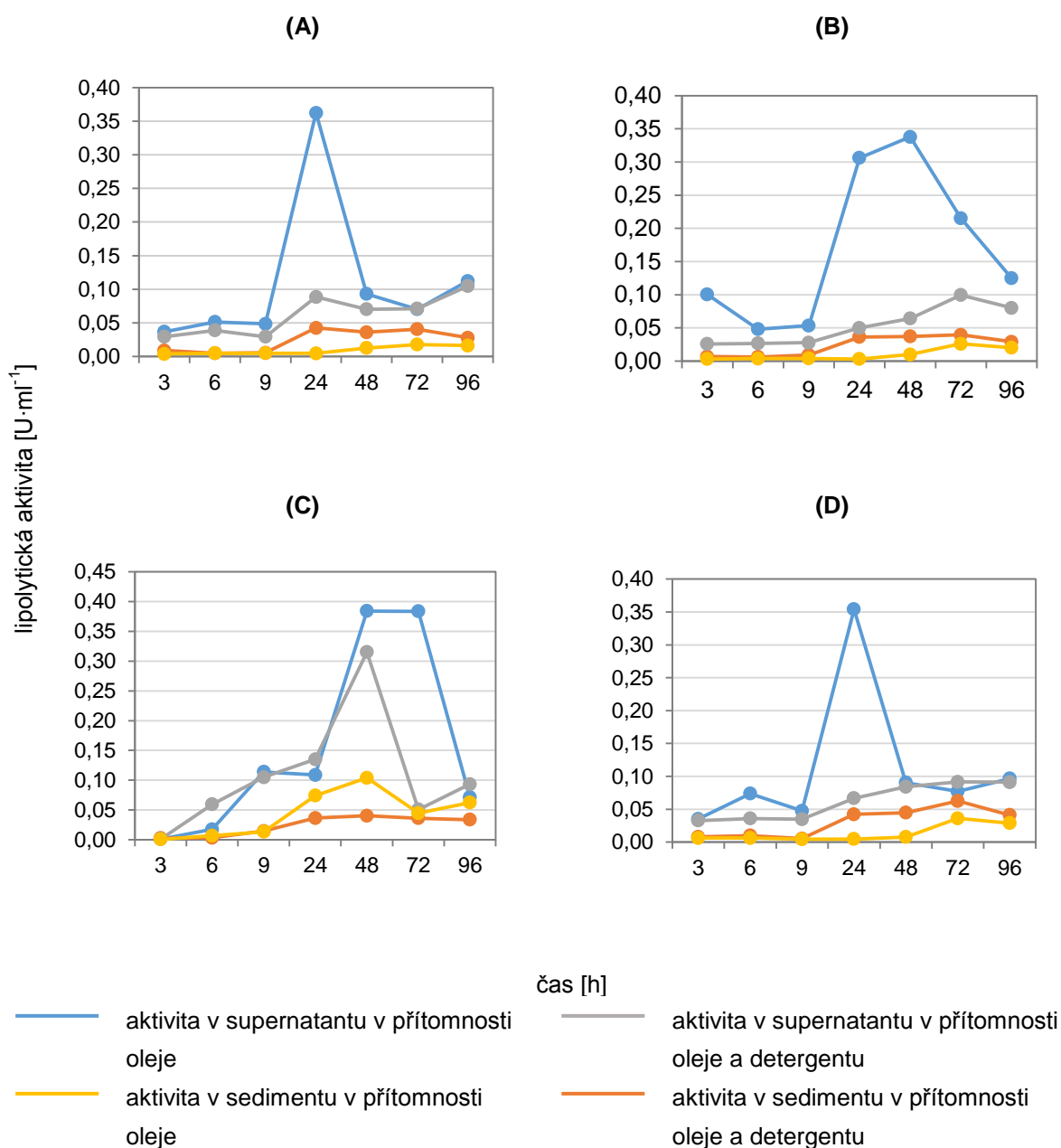
- ***Yarrowia lipolytica***

Růstové křivky *Yarrowia lipolytica* v přítomnosti detergentu vykazují, s výjimkou řepkového oleje, pozdější nástup exponenciální fáze, ve 24. hodině, oproti 9. hodině v médiích bez detergentu (**Graf 18**). Dále lze také pozorovat absenci fáze stacionární v pozdějších časových úsecích a snížení celkového množství biomasy na konci kultivace v přítomnosti olivového a slunečnicového oleje. Naopak v médiích s obsahem oleje řepkového a tepelně zpracovaného řepkového oleje byl v přítomnosti detergentu zaznamenán nárůst buněčné hmoty vyšší než v médiích bez detergentu.



Graf 18 Růstové křivky *Yarrowia lipolytica* v přítomnosti vybraných olejů a detergentu. (A) slunečnicový olej, (B) olivový olej, (C) řepkový olej, (D) tepelně zpracovaný řepkový olej.

Útlum produkce lipolytických enzymů v exponenciální fázi v médiích v přítomnosti detergentu byl zaznamenán také při kultivaci *Yarrowia lipolytica* (**Graf 19**). Lipolytické aktivity v médiích s obsahem detergentu a slunečnicového, olivového a tepelně zpracovaného řepkového oleje dosahovaly ve svých maximech nejvýše hodnoty $0,1 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$. V přítomnosti řepkového oleje nebyl útlum v produkci lipáz tak markantní, hodnota aktivity v maximu byla $0,315 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$ v médiu s detergentem oproti $0,384 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$ v médiu bez detergentu.



Graf 19 Průběh lipolytických aktivit *Yarrowia lipolytica* v přítomnosti oleje a detergentu. (A) slunečnicový olej, (B) olivový olej, (C) řepkový olej, (D) tepelně zpracovaný řepkový olej.

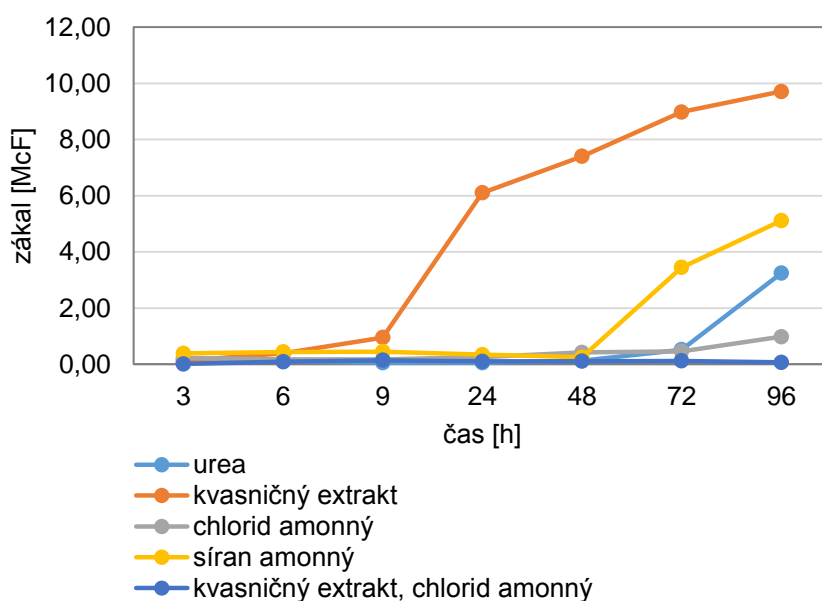
Při celkovém zhodnocení vlivu detergentu na růst a produkci lipáz mikroorganismy *Rhodotorula minuta* a *Yarrowia lipolytica* lze říci, že v přítomnosti detergentu dochází ve srovnání s médiem s obsahem oleje k utlumení jak produkce lipáz, tak k inhibici růstu buněk, přičemž růst buněk a produkce enzymů je silněji potlačena u *Yarrowia lipolytica*. Ačkoliv literatura uvádí použití detergentu jako permeabilizačního činidla, jehož působením by mělo dojít k uvolnění lipolytických enzymů vázaných na buňku, a tedy zvýšení lipolytické aktivity [39], v tomto případě se tak nestalo. Vysvětlení zřejmě leží v použití komplexního detergentu, který kromě povrchově aktivních látek obsahuje také látky s mikrobicidními účinky. Při detailnějším studiu složení použitého surfaktantu bylo zjištěno, že obsahuje benizothiazolinon a fenoxyetanol, tedy látky vykazující fungicidní a baktericidní účinky.

5 VLIV ZDROJE DUSÍKU NA RŮST MIKROORGANISMŮ A PRODUKCI LIPÁZ

Posledním krokem bylo zkoumání vlivu zdroje dusíku na produkci lipolytických enzymů. Reakce mikroorganismů byla studována v médiích s obsahem řepkového oleje a organických a anorganických zdrojů N v množství 1 % (w/v). Z organických zdrojů byla použita močovina a kvasničný extrakt, z anorganických pak síran amonný a chlorid amonný. Dále byla použita kombinace organického a anorganického zdroje, a to kvasničný extrakt a chlorid amonný. [54]

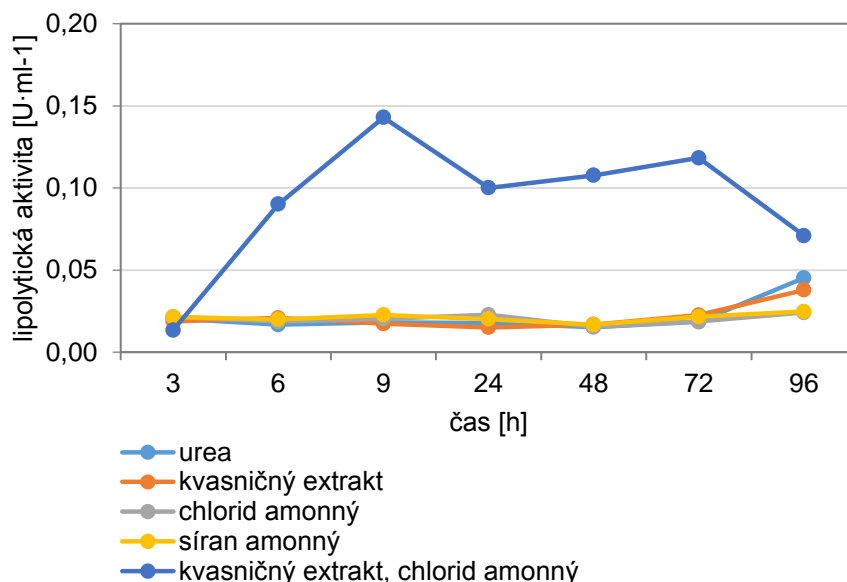
- ***Rhodotorula minuta***

Při pohledu na růstové křivky lze v médiích s jednoduchým zdrojem dusíku pozorovat posun počátku exponenciální fáze do 48. hodiny (v případě síranu amonného) a do 72. hodiny (v případě močoviny a chloridu amonného), oproti médiu, které obsahovalo kombinovaný zdroj dusíku (**Graf 20**). Nárůst biomasy v médiu s chloridem amonným je pak téměř nulový. Největší množství buněčné hmoty bylo pozorováno v médiu s kombinovaným zdrojem dusíku, a to 9,71 jednotek McFarlanda.



Graf 20 Růstové křivky *Rhodotorula minuta* v přítomnosti různých zdrojů dusíku.

Produkce lipáz byla v porovnání s kombinovaným zdrojem dusíku v přítomnosti jednoduchých zdrojů spíše utlumena (**Graf 21**). Mezi jednoduchými zdroji pak nebyl zaznamenán žádný výrazný rozdíl, lipolytická aktivita u žádného z testovaných zdrojů dusíku nepřesáhla hodnotu $0,05 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$.

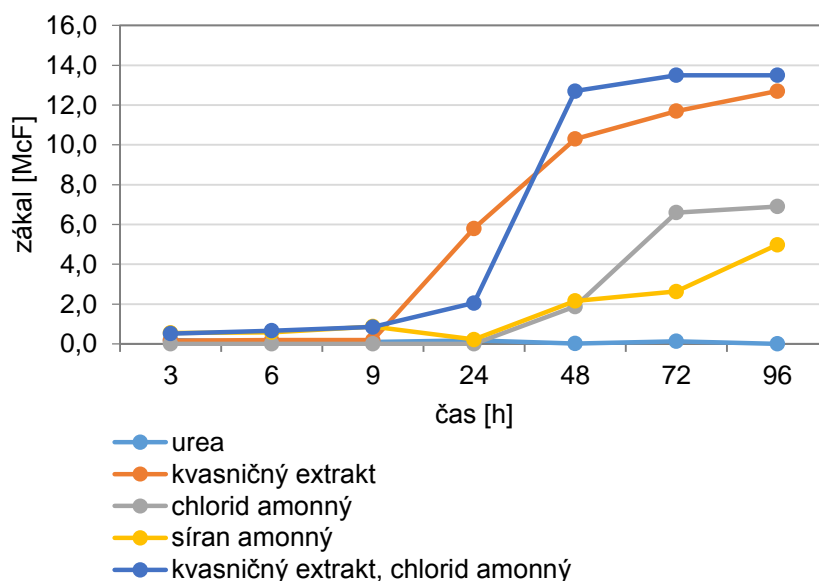


Graf 21 Produkce lipolytických enzymů *Rhodotorula minuta* v přítomnosti různých zdrojů dusíku.

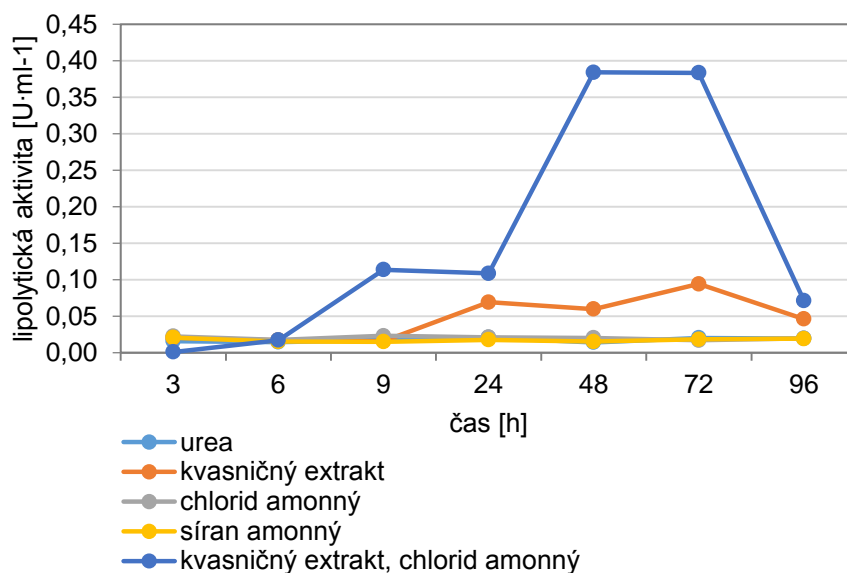
- ***Yarrowia lipolytica***

Největší nárůst buněčné hmoty byl zaznamenán v přítomnosti kombinovaného zdroje dusíku, a to 13,5 jednotek McFarlanda v 72. hodině kultivace, a kvasničního extraktu, a to 12,7 jednotek McFarlanda v 96. hodině kultivace (**Graf 22**). V případě anorganických zdrojů dusíku bylo zaznamenáno opoždění počátku exponenciální fáze (posun do 24. hodiny) a celkový menší nárůst biomasy. V přítomnosti močoviny byl přírůstek buněčné hmoty během celé kultivace nulový.

Přítomnost anorganických solí a močoviny má na lipolytickou aktivitu *Yarrowia lipolytica* spíše inhibiční účinky (**Graf 23**). V médiích s močovinou, síranem amonným a chloridem amonným byl průběh lipolytické aktivity během kultivace konstantní, nezávisle na růstové fázi, ve které se kultura nacházela. Aktivita nepřesáhla hodnotu $0,02 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$, lze ji tedy hodnotit jako zanedbatelnou. Nejvýraznější produkce lipáz byla zaznamenána v přítomnosti kombinovaného zdroje dusíku, s maximem $0,384 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$ v 48. a 72 hodině kultivace.



Graf 22 Růstové křivky *Yarrowia lipolytica* v přítomnosti různých zdrojů dusíku.



Graf 23 Produkce lipolytických enzymů *Yarrowia lipolytica* v přítomnosti různých zdrojů dusíku.

Jako nejvhodnější zdroj dusíku se tedy jeví kombinace organické komplexní sloučeniny a anorganické látky, v tomto případě kvasničného extraktu a chloridu amonného. Získané výsledky lze velmi těžko porovnat s daty z odborné literatury, neboť jednotlivé výsledky experimentů, při kterých byla testována vhodnost různých zdrojů dusíku pro produkci lipáz *Yarrowia lipolytica*, se velmi liší. Kebabci et al. [54] dosahovali nejvyšších hodnot produkce lipáz v přítomnosti síranu amonného, dusičnanu amonného, tedy anorganických zdrojů uhlíku, a močoviny. Močovina pak byla vyhodnocena jako jeden z vhodných zdrojů dusíku také ve studii Corzo et al. [57], avšak tato studie nepotvrzuje zvýšení aktivity v médiích s obsahem síranu amonného.

ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo otestovat vybrané mikroorganismy s potenciálem využití při čištění odpadních vod z potravinářských provozů na produkci lipáz v přítomnosti různých zdrojů uhlíku, dusíku a v přítomnosti detergentu. Testovány byly tyto mikroorganismy: *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces marxianus*, *Rhodotorula minuta*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula graminis*, *Bacillus subtilis* a *Geobacillus stearothermophilus*.

Makroskopický screening prokázal schopnost mikroorganismů *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces marxianus*, *Rhodotorula minuta*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula graminis* a *Bacillus subtilis* produkovat lipolytické enzymy. U bakterie *Geobacillus stearothermophilus* schopnost produkce lipáz prokázána nebyla.

Produkce lipáz není u těchto mikroorganismů striktně indukována přítomností lipidu, ale jejich tvorba je ovlivněna i přítomností substrátu sacharidového charakteru.

V médiích, kde byl jako jediný zdroj uhlíku olej, byly nejvyšší hodnoty produkce lipolytických enzymů zaznamenány v přítomnosti řepkového a olivového oleje, a to jak při kultivaci *Rhodotorula minuta*, tak *Yarrowia lipolytica*. Hodnota pH kultivačního média *Rhodotorula minuta* v průběhu kultivace vzrostla z kyselé oblasti do oblasti zásadité, zatímco pH média *Yarrowia lipolytica* během kultivace kleslo do oblasti silně kyselé.

Při studiu vlivu detergentu na růst mikroorganismů a produkci lipáz byly pozorovány inhibiční účinky.

Při studování vlivu různých zdrojů dusíku byly nejvyšší hodnoty produkce lipolytických enzymů zaznamenány v médiích s obsahem kvasničného extraktu a chloridu amonného, tedy v přítomnosti organického i anorganického zdroje dusíku. Lipolytická aktivita v přítomnosti pouze anorganických zdrojů dusíku pak byla téměř nulová.

SEZNAM LITERATURY

- [1] GILHAM, D., LEHNER, R.: Techniques to measure lipase and esterase activity in vitro. *Methods*, vol. 36, no. 2, pp. 139–47, Jun. 2005.
- [2] SALLEH, M., BASRI, A.B.: *New lipases and proteases*, 3rd ed. New York, NY: Nova Science Publishers, 2006, p. 159.
- [3] MALA, J.S., TAKEUCHI, S.: Understanding structural features of microbial lipases - an overview. *Anal. Chem. Insights*, vol. 3, pp. 9–19, Jan. 2008.
- [4] SVENDSEN, A.: *Enzyme functionality: design, engineering and screening*. New York, NY: Marcel Dekker, 2004, p. 667.
- [5] SCHMID, R.D., VERGER, R.: *Lipases: Interfacial Enzymes with Attractive Applications. Angew. Chemie Int. Ed.*, vol. 37, no. 12, pp. 1608–1633, 1998.
- [6] WONG, D. W.: *Food enzymes: structure and mechanisms*, 11th ed. New York, NY: Chapman, 1995, p. 390.
- [7] TAKWA, H. W., GARDNER, M.: Lipase specificity and selectivity engineering, kinetics and applied catalysis. 13th ed. Stockholm, Sweden: Skolan för bioteknologi, Kungliga Tekniska högskolan, 2002, p. 716.
- [8] GUPTA, R., GUPTA, N., RATHI, P.: Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 64, no. 6, pp. 763–81, Jun. 2004.
- [9] KUO, H. W., GARDNER, T.M.: *Lipid biotechnology*. Basel, Switzerland: Marcel Dekker, 2002.
- [10] JAEGER, K. E., RANSAC, S., DIJKSTRA, B., COLSON, W.C., VAN HEUVEL, M., MISSET, O.: Bacterial lipases. *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 15, no. 1, pp. 29–63, Sep. 1994.
- [11] PATIL, K. J., CHOPDA, M. Z., MAHAJAN, R. T.: Lipase biodiversity. *Indian J. Sci. Technol.*, vol. 4, no. 8, pp. 971–982, 2011.
- [12] BROCKERHOFF, R. G., JENSEN, H.: *Lipolytic enzymes*. 10th ed. New York, NY: Academic Press, 1974, p. 330.
- [13] DALMAU, E., MONTESINOS, J., LOTTI, M., CASAS, C.: Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa*. *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 26, no. 9–10, pp. 657–663, Jun. 2000.
- [14] DOMÍNGUEZ, A., DEIVE, F. J., SANROMÁN, M. A., LONGO, M. A.: Biodegradation and utilization of waste cooking oil by *Yarrowia lipolytica* CECT 1240. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, vol. 112, no. 11, pp. 1200–1208, Nov. 2010.
- [15] RATHI, P., SAXENA, R., GUPTA, R.: A novel alkaline lipase from *Burkholderia cepacia* for detergent formulation. *Process Biochem.*, vol. 37, no. 2, pp. 187–192, Oct. 2001.

- [16] LAKSHMI, B. S., KANGUEANE, P. , ABRAHAM, B., PENNATHUR, G.: Effect of vegetable oils in the secretion of lipase from *Candida rugosa* (DSM 2031). *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 29, no. 1, pp. 66–70, Jul. 1999.
- [17] SATYANARAYANA, B. N., JOHRI, T.: *Microbial diversity: Current perspectives and potential applications*. Reading: Paths, 2005, p. 1033.
- [18] SATYANARAYANA, T. G., KUNZE, T.: *Yeast biotechnology: Diversity and applications*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2009, p. 737.
- [19] SANGEETHA, R., ARULPANDI, I., GEETHA, A.: Bacterial lipases as potential industrial biocatalysts: an overview,” *Res. J. Microbiol.*, vol. 6, no. 1, pp. 1–24, Jan. 2011.
- [20] GOPINATH, S. C. B., ANBU, P., LAKSHMIPRIYA, T., HILDA, A.: Strategies to characterize fungal lipases for applications in medicine and dairy industry. *Biomed Res. Int.*, vol. 2013, p. 154549, Jan. 2013.
- [21] BARROS, M., FLEURI, L. F., MACEDO, G. A.: Seed lipases: sources, applications and properties - a review. vol. 27, no. 01, pp. 15–29, 2010.
- [22] TVRZOVÁ, Z., CHUMCHALOVÁ, L., NĚMEC, J., PÁČOVÁ, M.: *Miniatlas mikroorganismů*. 2006. [Online]. Dostupné z: <http://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/ps06/mikroorg/web/index.html>. [cit. 21.3.2014].
- [23] VOS, W., GARRITY, P., JONES, G., KRIEG, D., LUDWIG, N.R., RAINEY, W., SCHLEIFER, F.A., WHITMAN, K.H.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes*. 2nd ed. New York, NY: Springer, 2009, p. 1450.
- [24] DRÖGE, M. J., RÜGGERBERG, C. J., VAN DER SLOOT, A. M., SCHIMMEL, J., DIJKSTRA, D. S., VERHAERT, R. M., REETZ, M. T., QUAX, W. J.: Binding of phage displayed *Bacillus subtilis* lipase A to a phosphonate suicide inhibitor. *J. Biotechnol.*, vol. 101, no. 1, pp. 19–28, Feb. 2003.
- [25] HASAN, A., HAMEED, F.: Optimization of lipase production from *Bacillus* sp. *Pakistan J. Bot.*, vol. 31, no. 33, pp. 789–796, 2001.
- [26] WESTERS, H., BRAUN, P. G., WESTERS, L., ANTELMANN, H., HECKER, M., JONGBLOED, J. D. H., YOSHIKAWA, H., TANAKA, T., VAN DIJL, J. M., QUAX, W. J.: Genes involved in SkfA killing factor production protect a *Bacillus subtilis* lipase against proteolysis,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 71, no. 4, pp. 1899–908, Apr. 2005.
- [27] COOREVITS, A., DINSDALE, A. E. , HALKET, G., LEBBE, L., DE VOS, P., VAN LANDSCHOOT, A., LOGAN, N. A.: Taxonomic revision of the genus *Geobacillus*: emendation of *Geobacillus*, *G. stearothermophilus*, *G. jurassicus*, *G. toebii*, *G. thermodenitrificans* and *G. thermoglucosidans* (nom. corrig., formerly ‘thermoglucosidasius’); transfer of *Bacillus thermantarcticus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 62, no. 7, pp. 1470–85, 2012.
- [28] NAZINA, T. N., TOUROVA, T. P., POLTARAUS, A. B., NOVIKOVA, E. V., GRIGORYAN, A. A., IVANOVA, A. E., LYSSENKO, A. M., PETRUNYAKA, V.V., OSIPOV, G. A., BELYAEV, S. S., IVANOV, M.V.: Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen . nov ., sp . nov . and *Geobacillus uzenensis* sp . nov . from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 51, pp. 433–446, 2001.

- [29] BALAN, R., MAGALINGGAM, A., IBRAHIM, N., RAHIM, D.: Thermostable lipase production by *Geobacillus thermodenitrificans* in a 5-L stirred-tank bioreactor. *Internet J. Microbiol.*, vol. 8, no. 2, 2010.
- [30] HOOG, G.: *Atlas of clinical fungi*. 2nd ed. Utrecht: Centraalbureau Schimmelcultures, 2001, p. 1160.
- [31] RATLEDGE, J. P., WYNN, C.: The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Advances in applied microbiology*, Amsterdam: Academic Press, 2002, pp. 1–44.
- [32] HATZINIKOLAOU, D. G., KOURENTZI, E., STAMATIS, H., CHRISTAKOPOULOS, P., KOLISIS, F. N., KEKOS, D., MACRIS, B. J.: A novel lipolytic activity of *Rhodotorula glutinis* cells: Production, partial characterization and application in the synthesis of esters. *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 88, no. 1, pp. 53–56, Jan. 1999.
- [33] RATLEDGE, C.: Lipids and their metabolism. in *The yeasts*, 2nd ed., J. S. Harrison, A.H. Rose, Ed. London: Academic Press, 1993, p. 620.
- [34] PAPAPARASKEVAS, D.: Optimizing production of extracellular lipase from *Rhodotorula glutinis*. *Biotechnol. Lett.*, vol. 14, no. 5, pp. 397–402, 1992.
- [35] CINELLI, G., CUOMO, F., HOCHKOEPLER, A., CEGLIE, A., LOPEZ, F.: Use of *Rhodotorula minuta* live cells hosted in water-in-oil macroemulsion for biotransformation reaction. *Biotechnol. Prog.*, vol. 22, no. 3, pp. 689–95. 2006.
- [36] GALAFASSI, S., CUCCHETTI, D., PIZZA, F., FRANZOSI, G., BIANCHI, D., COMPAGNO, C.: Lipid production for second generation biodiesel by the oleaginous yeast *Rhodotorula graminis*. *Bioresour. Technol.*, vol. 111, pp. 398–403, 2012.
- [37] FICKERS, P., MARTY, A., NICAUD, J. M.: The lipases from *Yarrowia lipolytica*: genetics, production, regulation, biochemical characterization and biotechnological applications. *Biotechnol. Adv.*, vol. 29, no. 6, pp. 632–44, 2011.
- [38] PIGNEDE, G., WANG, H., FUDALEJ, F., GAILLARDIN, C., SEMAN, M., NICAUD, J.-M.: Characterization of an extracellular lipase encoded by LIP2 in *Yarrowia lipolytica*. *J. Bacteriol.*, vol. 182, no. 10, pp. 2802–2810, 2000.
- [39] NAJJAR, A., ROBERT, S., GUÉRIN, C., VIOLET-ASTHER, M., CARRIÈRE, F.: Quantitative study of lipase secretion, extracellular lipolysis, and lipid storage in the yeast *Yarrowia lipolytica* grown in the presence of olive oil: analogies with lipolysis in humans.,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 89, no. 6, pp. 1947–62, 2011.
- [40] KURTZMAN, C. P.: Molecular taxonomy of the yeasts. in *Yeast*, vol. 10, no. 13, pp. 1727–1740, 1994.
- [41] DEIVE, F. J., COSTAS, M., LONGO, M. A.: Production of a thermostable extracellular lipase by *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnol. Lett.*, vol. 25, no. 17, pp. 1403–6, 2003.
- [42] HASAN, F., SHAH, A. A., HAMEED, A.: Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 39, no. 2, pp. 235–251, 2006.

- [43] DIVAKAR, S.: *Enzymatic Transformation*. India: Springer India, 2013. ISBN 978-813-2208-723.
- [44] VERMA, A. K., THAKUR, N., BHATT, S.: Microbial Lipases: Industrial applications and properties (a review),” *Int. Res. J. Biol. Sci.*, vol. 1, no. 8, pp. 88–92, 2012.
- [45] *Nařízení Evropského parlamentu a Rady 1332/2008 ze dne 16. prosince 2008, o potravinářských enzymech*. In: EUR-lex [právní informační systém]. Úřad pro publikace Evropské unie. Dostupné z: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:354:0016:0033:CS:PDF> [cit. 21.3.2014]
- [46] ARAVINDAN, R., ANBUMATHI, P., VIRUTHAGIRI, T.: Lipase applications in food industry,” vol. 6, pp. 141–158, 2007.
- [47] SUKOVÁ, I.: Enzymy v pekařství pro snížení aditiv [online]. 2012. Dostupné z: <http://www.agronavigator.cz/default.asp?ids=153&ch=13&typ=1&val=120970>. [cit. 17.3. 2014].
- [48] JAEGER, K.: Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol.*, vol. 16, no. 9, pp. 396–403, 1998.
- [49] SKOPAL, J., HÁJEK, F., KUTÁLEK, M., KOCÍK, P.: Bionafta - náhrada fosilních paliv [online]. Dostupné z: http://kfch.upce.cz/htmls/vedecka_cinnost_bionafta.htm. [cit. 19.3. 2014].
- [50] KOCNA, P.: Sérové lipázy [online]. *Datový standard Ministerstva zdravotnictví ČR*, 2007. Dostupné z: http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD_DS3/hypertext/AJD XI.htm. [cit. 21.3. 2014].
- [51] SEIFERT, B.: Substitute pankreatických enzymů,” *Practicis*, no. 7, pp. 32–34, 2013.
- [52] WEHR, J. F., FRANK, H.M.: *Standard methods for the examination of dairy products*, 17th ed. Washington, D.C.: American Public Health Association, p. 546. 2004.
- [53] HORÁKOVÁ, D., NĚMEC, M.: Laboratorní cvičení z fyziologie bakterií [online]. 1 vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2007 El-portál. Dostupné z: <<http://is.muni.cz/elportal/?id=713185>>. ISSN 1802-128X. [cit. 27.3. 2014].
- [54] KEBABCI, N., CİHANGİR, O.: Comparison of three *Yarrowia lipolytica* strains for lipase production: NBRC 1658, IFO 1195, and a local strain,” *Turkish J. Biol.*, vol. 36, no. 1, pp. 15–24, 2012.
- [55] VELÍŠEK, J., HAJŠLOVÁ, J.: *Chemie potravin I*, 3rd ed. Havlíčkův Brod: OSSIS, 2009, p. 602. ISBN: 978-80-86659-15-2
- [56] HADEBALL, W.: Production of lipase by *Yarrowia lipolytica*, I. Lipases from Yeasts (Review). *Acta Biotechnol.*, vol. 11, no. 2, pp. 159–167, 1991.
- [57] CORZO, G., REVAH, S.: Production and characteristics of the lipase from *Yarrowia lipolytica* 681. *Bioresour. Technol.*, vol. 70, no. 2, pp. 173–180, 1999.

